

Studien zur Konversion photochemischer und funktioneller Eigenschaften verschiedener Blaulichtrezeptoren

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Claudia Schroeder
aus Rathenow

Marburg/ Lahn 2009

Vom Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg
als Dissertation angenommen am: 13.10.2009

Erstgutachter: Prof. Dr. Lars-Oliver Essen (Fachbereich Chemie, Marburg)

Zweitgutachter: Prof. Dr. Alfred Batschauer (Fachbereich Biologie, Marburg)

Tag der mündlichen Prüfung am: 26.10.2009

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Thema:

**"Studien zur Konversion photochemischer und funktioneller Eigenschaften
verschiedener Blaulichtrezeptoren"**

selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als den von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Ort, Datum

Claudia Schroeder

Meinen Eltern

Im Verlauf der Promotion veröffentlichte Publikationen:

Schroeder, C., Werner, K., Otten, H., Krätzig, S., Schwalbe, H., Essen L.-O., (2008),
Influence of a Joining Helix on the BLUF Domain of the YcgF Photoreceptor from Escherichia coli
ChemBioChem, 9, 2463-2473.

Mailliet, J., Psakis, G., Schroeder, C., Kaltofen, S., Dürrwang, U., Hughes, J., Essen, L.-O.,
(2009),
Dwelling in the dark: procedures for the crystallography of phytochromes and other photochromic proteins
Acta Crystallogr. D, Akzeptiertes Manuskript.

Zusammenfassung

In BLUF-Domänen enthaltenden Proteinen und DNA-Photolyasen wechselwirkt das nichtkovalent gebundene FAD mit Blaulicht und initiiert eine lichtabhängige Signalkaskade bzw. DNA-Reparatur. In beiden Blaulichtrezeptorklassen wurden verschiedene subtypenspezifische funktionelle Eigenschaften beobachtet.

Ein Teil dieser Arbeit war die Konversion der *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domäne, welche den Subtyp II repräsentiert, in den Subtyp I (z.B. SyPixD). Zu diesem Zweck wurden verschiedene Oberflächenmutanten zweier in der *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domäne nicht konservierter Aminosäuren (Met 23 und Ala 90) biophysikalisch charakterisiert. Hierbei konnte eine erfolgreiche Konversion des Subtyp II in den BLUF-Domänen Subtyp I anhand veränderter photochemischer Eigenschaften dokumentiert werden. Diese photochemischen Veränderungen zeigten, dass die nativen Aminosäuren Met 23, sowie Ala 90 für einen Großteil der spezifischen Charakteristika der *E. coli* YcgF BLUF-Domäne verantwortlich sind. Zu diesen veränderten Charakteristika gehören blauverschobene Absorptionsmaxima des Signalzustandes, eine beschleunigte Licht-Dunkel-Konversion, die Flavintriplettzustände und die lichtinduzierte Konformationsänderung des eingefügten Trp 90. Zusätzlich konnte unter Generierung einer Y7F-Oberflächenmutante gezeigt werden, dass dieser in allen BLUF-Photorezeptoren konservierte Tyrosinrest auch im *E. coli* YcgF essentiell für die Schaltung der BLUF-Domäne ist. Aufgrund der fehlenden lichtinduzierten Rotverschiebung und der langlebigen Existenz einer radikalischen Flavinspezies wurde die Y7F-Mutante als Intermediat des BLUF-Photozyklus präsentiert, welches zwischen dem Grundzustand und der Ausbildung des Radikalpaars gefangen ist. Auf Grundlage dieser und zuvor bestimmter Resultate konnte ein möglicher blaulichtinduzierter *E. coli* YcgF BLUF-Domänen Photozyklus und Signalübertragungsweg vorgestellt werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die *A. thaliana* (6-4)-Photolyase in den Subtyp der CPD-Photolyasen umzuwandeln. Hierfür wurden Oberflächenmutanten hergestellt, die anstelle der nativen für die Bindung des (6-4)-Schadens benötigten Aminosäuren in ihrer katalytischen Bindungstasche spezifische für die Bindung und Reparatur von CPD-Schäden benötigte Aminosäurereste enthalten. Für alle aufgereinigten *A. thaliana* (6-4)-Photolyasemutanten wurde analog zum Wildtyp der katalytisch aktive, vollständig reduzierte FADH⁻-Zustand generiert und im Fall der K246R, H364N_L365R und W408Y Varianten eine leicht erhöhte Bindungsaffinität zum CPD-Schaden festgestellt. Weiter konnte gezeigt werden, dass die durch Mutagenese eingefügten Veränderungen nicht ausreichen, um die für die CPD-Reparaturaktivität im *A. thaliana* (6-4)-Enzym benötigten Interaktionen zu gewährleisten,

d. h. die (6-4)-Photolyase in den CPD-Subtyp zu konvertieren, im Gegensatz zum YcgF BLUF-Blaulichtrezeptor. Als Ursache dieser Beobachtung wurde ein unterschiedliches Bindungsverhalten beider DNA-Photolyasesubtypen dokumentiert. Hierbei wurden distinkte Unterschiede in der Art des Flippmechanismus im Verlauf der DNA-Bindung, den Deformierungsgrad der geschädigten DNA betreffend, sowie in der Orientierung der gebundenen doppelsträngigen DNA aufgezeigt.

Im letzten Teilprojekt wurde die (6-4)-Photolyase aus dem halophilen Eukaryoten *D. salina* untersucht. Diese Photolyase weist *in vitro* einen sehr stabilen neutralen semichinoiden FAD-Zustand auf, der möglicherweise einen Signalzustand ähnlich dem pflanzlicher und tierischer Cryptochrome darstellt. Im Verlauf der Photoaktivierung wurden strukturelle Veränderungen der C-terminalen α -helikalen Extension der *D. salina* Enzym beobachtet, die eventuell für die Interaktion zwischen dem halbreduzierten Enzym und einem Signalpartner essentiell sind. Anhand dieser Resultate wurde für die *D. salina* (6-4)-Photolyase neben ihrer Photolyaseaktivität eine zusätzliche Cryptochromaktivität prognostiziert, ähnlich dem *A. nidulans* Cryptochrom A, sowie ein möglicher Mechanismus des Blaulichtrezeptors vorgestellt, der beide Funktionalitäten kombiniert. Demnach präsentiert das *D. salina* (6-4)-Enzym möglicherweise einen weiteren Schnittpunkt zwischen Photolyasen und Cryptochromen.

Summary

In BLUF domain containing proteins and DNA-photolyases, a noncovalently bound FAD chromophore interacts with blue-light and initiates a signalling cascade and DNA-repair, respectively. In both blue-light receptor classes, different subtype specific functional properties were observed.

One part of this study was the conversion of the *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF domain, a member of subtype II, into subtype I (e.g. SyPixD). To this purpose, various surface mutants of two amino acids that are not conserved in the *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF domain (Met 23 and Ala 90) were characterized biophysically. Here, the successful conversion of the subtype II into the BLUF domain subtype I was shown by changed photochemical properties. Furthermore, on the basis of these photochemical variances was shown that the native amino acids Met 23 as well as Ala 90 are responsible for a major part of these *E. coli* YcgF BLUF domain specific characteristics. These changed characteristics include blue-shifted absorption maxima of the signalling state, an accelerated light-dark-conversion, the flavin triplet states and light-induced conformational alteration of the inserted Trp 90. Additionally, by producing the Y7F surface mutant it was shown, that this tyrosine residue, being conserved in all BLUF photoreceptors, is essential for the photo switch of the *E. coli* YcgF BLUF domain, too. Due to the lacking light induced red-shift and a long-living radical flavin species the Y7F mutant was presented as an intermediate of the BLUF photocycle that get arrested between the ground state and the formation of the radical pair. Based on these and previous determined results a possible blue-light induced photocycle and a signal transduction pathway was proposed for the *E. coli* YcgF BLUF domain.

A further aim of this study was to convert the *A. thaliana* (6-4) photolyase into the CPD photolyases subtype. Accordingly, surface mutants were produced, which contain in their catalytic site amino acid residues mediating the binding and repair of the CPD lesion instead of the native amino acids required for the binding of the (6-4) lesion. For all purified *A. thaliana* (6-4) photolyases mutants, the catalytic active, completely reduced FADH⁻ state was generated like in the wild type. In the case of the K246R, H364N_L365R and W408Y variants a slightly increased binding affinity to the CPD lesion was observed. Furthermore it could be pointed out that the inserted changes are not sufficient to induce CPD repair activity in the *A. thaliana* (6-4) enzyme. Hence, the conversion of the (6-4) photolyase into the CPD subtype was not successful, in contrast to the YcgF BLUF blue-light photoreceptor. The different binding behaviour was documented to be responsible for this negative observation.

Here, distinct varieties were shown in the manner of the flipping mechanism during DNA binding, in the degree of deformation and in the orientation of the bound duplex DNA.

In one last subproject, the (6-4) photolyase from the halophilic eucaryote *D. salina* was investigated. This (6-4) photolyase possesses a very stable neutral semichinoide FAD state *in vitro*, which presents a possible signalling state similar to plant and animal cryptochromes. Additionally, structural changes in the C-terminal α -helical extension of the *D. salina* (6-4) photolyase induced by photo activation, that are potentially essential for the interaction between the half reduced enzyme and a signalling partner could be observed. On the basis of these results, an additional cryptochrome activity was proposed for the *D. salina* (6-4) photolyase, similar to the *A. nidulans* cryptochrome A, and a potential mechanism was presented that combines both functionalities. Thus, the *D. salina* (6-4) enzyme may represent a link between photolyases and cryptochromes.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Photorezeptoren.....	1
1.2. BLUF-Domänen enthaltende Proteine	2
1.2.1. Strukturen der BLUF-Domänen enthaltenden Proteine	3
1.2.2. Photozyklus und Signalweiterleitung der BLUF-Domänen enthaltenden Proteine.....	4
1.2.3. <i>E. coli</i> YcgF	6
1.3. Photolyase / Cryptochrom Familie.....	9
1.3.1. Schädigung der DNA	9
1.3.2. Schädigung der DNA durch UV-Strahlung	10
1.3.3. CPD- und (6-4)-Photoprodukte.....	11
1.3.4. DNA-Photolyasen	12
1.3.5. DNA-Bindung der (6-4)- und CPD-DNA Photolyasen	15
1.3.6. Reparaturmechanismen.....	17
1.3.7. Die <i>A. thaliana</i> (6-4)-Photolyase	19
1.3.8. Die <i>D. salina</i> (6-4)-Photolyase	20
1.3.9. Cryptochrome	20
1.4. Zielsetzung und Motivation	23
2. Material.....	25
2.1. Geräte	25
2.2. Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien	27
2.3. Vektoren	28
2.4. Mikroorganismen	29
2.4.1. <i>E. coli</i> DH5 α	29
2.4.2. TOP10F'	29
2.4.3. <i>E. coli</i> BL21-Gold (DE3).....	30
2.4.4. <i>E. coli</i> Rosetta (DE3)	30
2.5. Oligonukleotide	30
2.5.1. Primer.....	30
2.5.2. Oligonukleotide für Gelshift-Assay	32
2.6. Kulturmedien.....	33

2.7. Antibiotika.....	34
3. Methoden.....	35
3.1. Molekularbiologische Methoden.....	35
3.1.1. Plasmidpräparation	35
3.1.2. Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	36
3.1.3. Ortsspezifische Mutagenese.....	38
3.1.4. PCR Aufreinigung	39
3.1.5. Agarosegelelektrophorese.....	40
3.1.6. DNA-Extraktion aus präparativen Agarosegelen	41
3.1.7. Hydrolytische Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	41
3.1.8. Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration	42
3.1.9. Ligation	42
3.1.10. Entsalzung von Ligationsansätzen und Mutageneseansätzen	42
3.1.11. DNA-Sequenzanalyse	43
3.1.12. Transformation kompetenter Zellen.....	43
3.1.13. Stammhaltung	45
3.1.14. Herstellung T<>T haltiger DNA.....	45
3.2. Proteinchemische Methoden	48
3.2.1. Heterologe Genexpression in <i>E. coli</i>	48
3.2.2. Zellaufschluss	49
3.2.3. Reinigung von <i>Inclusion Bodies</i>	50
3.2.4. Rückfaltung der <i>Inclusion Bodies</i>	50
3.2.5. Ni ²⁺ -NTA Affinitätschromatographie.....	51
3.2.6. Ultrafiltration	51
3.2.7. Größenausschlusschromatographie.....	52
3.2.8. Umpufferung.....	52
3.3. Analytische Methoden.....	53
3.3.1. Bestimmung der Proteinkonzentration.....	53
3.3.2. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	54
3.3.3. Immunoblotanalyse (Western Blot)	55
3.3.4. Bestimmung des Protein-Kofaktor-Verhältnisses.....	56
3.3.5. CD-Spektroskopie.....	57
3.3.6. EPR-Spektroskopie	58
3.3.7. UV/VIS-Spektroskopie	59

3.3.8. Herstellung verschiedener Redoxzustände des Flavins im Protein.....	59
3.3.9. Kinetikmessungen.....	59
3.3.10. Gelshift-Assay.....	60
3.3.11. DNA-Reparatur-Assay.....	61
3.4. Proteinkristallisation.....	63
3.4.1. Kristallisationsscreening	64
3.4.2. Optimierung der Proteinkristallisation.....	64
3.4.3. Cokristallisation	65
4. Ergebnisse	66
4.1. Veränderung der photochemischen Eigenschaften der <i>E. coli</i> YcgF-(1-137) BLUF Domäne in Richtung kurzer BLUF Domänen	66
4.1.1. Produktion und Aufreinigung der verschiedenen Mutanten der YcgF-(1-137) BLUF-Domäne.....	68
4.1.2. Untersuchung der nativen Faltung und Proteinstabilität der Mutanten der <i>E. coli</i> YcgF-(1-137) BLUF-Domäne	72
4.1.3. Untersuchung des photochemischen Verhaltens der Mutanten der <i>E. coli</i> YcgF-(1-137) BLUF-Domäne	77
4.1.4. Analyse der Dunkelreversion der Mutanten der <i>E. coli</i> YcgF-(1-137) BLUF-Domäne	80
4.1.5. Untersuchung des Triplettzustandes der Mutanten der <i>E. coli</i> YcgF-(1-137) BLUF-Domäne.....	82
4.2. Konversion der Bindungs- und Reparatoreigenschaften der <i>A. thaliana</i> (6-4)-DNA-Photolyase.....	86
4.2.1. Expression und Aufreinigung der nativen <i>A. thaliana</i> (6-4)-Photolyase und ihrer verschiedenen Mutanten.....	87
4.2.2. Untersuchung der nativen Faltung und Proteinstabilität.....	90
4.2.3. UV/VIS Spektroskopische Untersuchungen der nativen <i>A. thaliana</i> (6-4)-Photolyase und ihrer Mutanten	93
4.2.4. DNA-Bindungs- und Reparaturassays	96
4.2.5. Kristallisation.....	102
4.3. Photochemische Analyse der <i>D. salina</i> (6-4)-DNA-Photolyase.....	105
4.3.1. Expression und Aufreinigung	105
4.3.2. Untersuchung der photochemischen Eigenschaften der <i>D. salina</i> (6-4)-Photolyase. 108	

4.3.3. Untersuchung der nativen Faltung und Proteinstabilität der verschiedenen Redoxzustände der <i>D. salina</i> (6-4)-Photolyase	115
4.3.4. Bestimmung der Dissoziationskonstanten	118
5. Diskussion	122
5.1. Konversion und Analyse der photochemischen Eigenschaften der <i>E. coli</i> YcgF-(1-137) BLUF-Domäne	122
5.1.1. Allgemeine Eigenschaften der verschiedenen <i>E. coli</i> YcgF-(1-137) BLUF-Domänen	123
5.1.2. Einfluss der mutierten Aminosäurereste auf die photochemischen Eigenschaften der <i>E. coli</i> YcgF-(1-137) BLUF-Domäne	124
5.1.3. Die Temperatursensitivität der verschiedenen <i>E. coli</i> YcgF-(1-137) BLUF-Domänen	130
5.1.4. Der <i>E. coli</i> YcgF-(1-137) BLUF-Domänen Photozyklus	131
5.1.5. Signalweiterleitung in der <i>E. coli</i> YcgF-(1-137) BLUF-Domäne	134
5.1.6. Funktionelle Eigenschaften der <i>E. coli</i> YcgF-(1-137) BLUF-Domäne	138
5.1.7. Anwendungsbeispiel	139
5.2. Konversion der <i>A. thaliana</i> (6-4)-DNA-Photolyase in den CPD-Subtyp	141
5.2.1. Allgemeine Eigenschaften der rekombinanten <i>A. thaliana</i> (6-4)-Photolyasen	142
5.2.2. Einfluss der in der <i>A. thaliana</i> (6-4)-Photolyase ausgetauschten Aminosäuren auf die CPD-Substratspezifität	144
5.2.3. Unterschiede in der Erkennung bzw. Reparatur zwischen (6-4)- und CPD-Photolyasen	148
5.3. Analyse photoinduzierter struktureller Änderungen in der <i>D. salina</i> (6-4)-Photolyase	155
5.3.1. Allgemeine Eigenschaften der rekombinanten <i>D. salina</i> (6-4)-Photolyase	155
5.3.2. Photochemische Eigenschaften der <i>D. salina</i> (6-4)-Photolyase	156
5.3.3. Abhängigkeit des DNA-Bindungsverhalten vom Redoxzustand der (6-4)-Photolyase	158
5.3.4. Lichtinduzierte strukturelle Änderungen in der <i>D. salina</i> (6-4)-Photolyase	159
5.3.5. Lichtinduzierter Mechanismus der <i>D. salina</i> (6-4)-Photolyase	161
5.4. Ausblick	163
6. Anhang	165
6.1. Abbildungsverzeichnis	165

6.2. Tabellenverzeichnis.....	176
6.3. Maxima und Minima der Licht- minus Dunkelabsorptionsspektren der <i>E. coli</i> YcgF-(1-137) BLUF-Domänen	178
6.4. Temperaturabhängige Halbwertzeiten der <i>E. coli</i> YcgF-(1-137) BLUF-Domänen....	179
6.4.1. YcgF-(1-137)	179
6.4.2. YcgF-(1-137)_M23I	179
6.4.3. YcgF-(1-137)_M23L	179
6.4.4. YcgF-(1-137)_A90W.....	179
6.4.5. YcgF-(1-137)_M23I_A90W.....	179
6.5. Alignment verschiedener (6-4)-DNA-Photolyasen.....	180
6.6. Absorptionsmaxima der <i>A. thaliana</i> (6-4)-DNA-Photolyasen.....	182
6.7. Absorptionsspektren der <i>A. thaliana</i> (6-4)-DNA-Photolyasen	183
6.8. Photoaktivierungstest der <i>A. thaliana</i> (6-4)-DNA-Photolyasen	184
6.9. Chemische Reduktion der <i>A. thaliana</i> (6-4)-DNA-Photolyasen.....	185
6.10. Intensitäten der DNA-Reparaturassays der <i>A. thaliana</i> (6-4)-DNA-Photolyasen	186
6.11. DNA-Reparaturassays der <i>A. thaliana</i> (6-4)-DNA-Photolyasen	187
6.12. Kristallisationsansätze der <i>A. thaliana</i> (6-4)-DNA-Photolyase	188
6.13. Unterlagen zum synthetischen Gen der <i>D. salina</i> (6-4)-Photolyase	189
7. Danksagung:	194
8. Literatur	196

1. Einleitung

1.1. Photorezeptoren

Die Wahrnehmung von Licht und die Reaktion auf Änderungen der Lichtverhältnisse sind von großer Bedeutung für viele Organismen. Zur Anpassung an ihre Umgebung besitzen sie Photorezeptoren, die lichtsensitive Chromophore beinhalten, um Licht spezifischer Wellenlängen zu absorbieren. Die Absorption eines Photons führt zur Ausbildung eines angeregten Zustandes, der unter Zustandsänderung des Chromophors strukturelle Änderungen in der Proteinumgebung initiiert und so den Signalzustand des Photorezeptors generiert. Dieser Signalzustand interagiert mit nachgeschalteten Domänen und aktiviert auf diese Weise eine Signalkaskade.^[1] Anschließend kann der signalübertragende Photorezeptor wieder in den Grundzustand konvertieren und so den Signalvorgang unterbrechen, bis er ein neues Photon absorbiert.

In der Natur sind Photorezeptoren weit verbreitet und kommen in Bakteria, Archaea und Eukarya vor.^[2, 3] In diesen Organismen sind sie an der Regulation folgender Prozesse beteiligt: z. B. der Phototaxis,^[2] der blaulichtinduzierten Chloroplastenbewegung,^[3] Membranpolarisation,^[4] Photomorphogenese^[4] und dem Tag- und Nachtrhythmus in Pflanzen, dem Sehvorgang in Wirbeltieren,^[5] an der lichtabhängigen Genexpression^[6] und dem Nukleotidmetabolismus in Bakterien^[7] und der Reparatur von DNA-Photoschäden in Bakterien, Pflanzen und Tieren.^[8]

Photorezeptoren sind anhand der Art ihrer Chromophore, Proteindomänen bzw. photochemischen Reaktionen in verschiedene Klassen eingeteilt. Zu den sechs gut charakterisierten Photorezeptorfamilien gehören die Rhodopsine, Xanthopsine, Phytochrome, Phototropine, die BLUF-Domänen enthaltenden Proteine und die Photolyase/ Cryptochrom Familie.^[9] Die Chromophore der ersten drei Photorezeptorfamilien Retinal, p-Coumarinsäure und Billin-Derivate sind kovalent gebunden und isomerisieren lichtinduziert selektiv an einer Doppelbindung. Die letzten drei Blaulichtrezeptorfamilien besitzen gebundene Flavinderivate als Chromophore, deren chemische Struktur eine Isomerisierung während des Photozyklus nicht zulässt.^[9]

Die in den Phototropinen enthaltenen LOV-Domänen (Light Oxygen or Voltage) binden im Grundzustand nichtkovalent FMN. Dieses reagiert nach Blaulichtanregung mit einem konservierten Cysteinrest des Proteins und bildet ein Flavin(C4a)-Thiol-Addukt aus, welches in einer Dunkelreaktion wieder thermisch zerfällt.^[10] Getriggert durch die Ausbildung des

Thioladduktes werden die Wechselwirkungen zwischen der LOV-Domäne und ihrer C-terminalen J α -Helix gestört, was zu einer Entfaltung dieser Helix führt.^[11] Diese Entfaltung der J α -Helix aktiviert nun die C-terminale Kinasedomäne, welche das Phototropin autophosphoryliert und auf diese Weise die Signalkaskade startet.^[12] Auf die BLUF-Domänen enthaltenden Proteine und die Photolyase/ Cryptochrom Familie wird in den folgenden Kapiteln genauer eingegangen.

1.2. BLUF-Domänen enthaltende Proteine

Die BLUF-Domänen enthaltenden Proteine (sensors for blue-light-using EAD) nehmen Licht durch ihren nichtkovalent gebundenen Chromophor FAD wahr.^[13] Sie kommen in Bakterien, Pilzen und eukaryotischen Algen vor.^[14, 15] BLUF-Domänen enthaltende Proteine agieren als blaublichtinduzierte Antirepressoren und modulieren die Biofilmbildung,^[16] kontrollieren die Expression von Photosyntheseogenen^[17] und sind an der katalytischen Regulation sekundärer Botenstoffe,^[13, 14] sowie photophoben Antworten beteiligt.^[18]

BLUF-Domänen können einzelständig in Verbindung mit einem 30 bis 70 Aminosäuren langen C-Terminus oder als Teil komplexer Proteine in Verbindung mit weiteren Domänen, wie SCHICH-, EAL-, GGDEF- und Cyclase-Domänen vorkommen (Abb.1.1).^[14, 20] Zu den ersteren BLUF-Photorezeptoren gehören z.B. das SyPixD aus dem Cyanobakterium *Synechocystis sp.*,^[19] TePixD aus *Thermosynechococcus elongatus*^[20] und BlrB aus dem Purpurbakterium *Rhodobacter sphaeroides*.^[21] Als gut charakterisierte komplexe BLUF-Domänen enthaltende Proteine sind das AppA aus *R. sphaeroides*,^[22] das BlrP1 aus dem Darmbakterium *Klebsiella pneumoniae*,^[23] PAC aus der Alge *Euglena gracilis*,^[18] sowie das YcgF aus *Escherichia coli*^[24] zu nennen.^[13]

Alleinstehende BLUF-Domänen enthaltende Proteine

BLUF

Komplexe BLUF-Domänen enthaltende Proteine

BLUF SCHICH

BLUF EAL

BLUF Cyclase

Hth BLUF

Pas GGDEF EAL BLUF

Abbildung 1.1: Alleinstehende und komplexe BLUF-Domänen enthaltende Proteine. Gezeigt sind ebenfalls die verschiedenen Effektor-Domänen der komplexen BLUF-Photorezeptoren.

1.2.1. Strukturen der BLUF-Domänen enthaltenden Proteine

BLUF-Domänen besitzen eine $\beta_1\alpha_1\beta_2\beta_3\alpha_2\beta_4\beta_5$ Struktur, die einzigartig unter flavinbindenden Proteinen ist, jedoch Ähnlichkeit zur Ferredoxinfaltung aufweist.^[21, 23, 25-27] C-terminale Extensionen der BLUF-Domänen bilden eine Kappe bestehend aus zwei weiteren α -Helices $\alpha_3\alpha_4$.^[21, 23, 26, 27] In den Kristallstrukturen der BLUF-Photorezeptoren konnten unterschiedliche Oligomerisierungszustände beobachtet werden. So bildeten die allein stehenden BLUF-Domänen SyPixD und TePixD zwei Pentamere aus, die sich zu einem Dekamer zusammenlagern.^[26, 27] Im Gegensatz dazu zeigten AppA und BlrP1 dimere Strukturen (Abb. 1.2).^[14, 25]

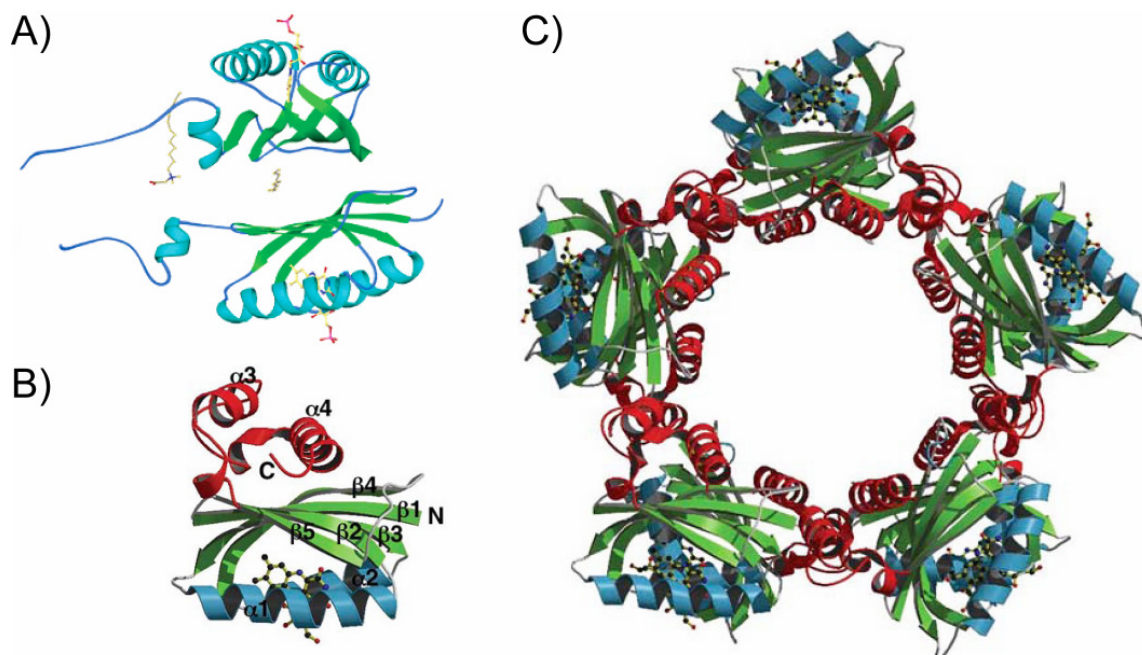


Abbildung 1.2: Kristallstrukturen zweier BLUF-Domänen. A) Dimer der *R. sphaeroides* AppA (PDB ID: 1YRX) und B) Monomer sowie C) Dekamer der *T. elongatus* TePixD BLUF-Domäne (PDB ID: 1XOP). Das AppA liegt sowohl in Lösung als auch in der Kristallstruktur als Dimer vor, während das TePixD in Lösung als Pentamer und Dekamer vorliegen kann, im Kristall jedoch nur das Dekamer beobachtet wird.^[25, 26, 28]

In allen Strukturen flankieren die beiden α_1 - und α_2 -Helices den Flavinisaloxazinring, während die β -Stränge ihn von einer dritten Seite abschirmen. Hierbei zeigen die über Salzbrücken gebundene Ribitylseitenkette und der Phosphatrest des Flavins zur Proteinoberfläche, so dass der in den Kristallstrukturen nicht aufgelöste Adenosinrest vom Lösungsmittel umgeben wäre.^[21, 23, 25-27]

Von den an der Bindung des Isoalloxazinrings über Wasserstoffbrücken beteiligten Aminosäureresten sind das Asparagin 45 und das Glutamin 63 (Bezeichnung gewählt nach

AppA) hervorzuheben. Hierbei bildet der konservierte Asparaginrest 45 Wasserstoffbrücken zum N3 und O4 und der hochkonservierte Glutaminrest 63 Wasserstoffbrücken zum N5 und O4 des Flavins aus und interagiert ebenso mit dem Hydroxylsauerstoffatom des hochkonservierten Tyrosin 21.^[21, 23, 26, 27] In diesen Strukturen liegt der in den meisten BLUF-Domänen enthaltene Tryptophanrest 104 an der Proteinoberfläche (W_{out} Konformation) vor. Befindet sich - wie für *R. sphaeroides* AppA beobachtet - der Tryptophanrest 104 in der Nähe des Flavinisoalloxazinrings (W_{in} Konformation), bildet das Glutamin 63 anstatt der Wasserstoffbrücke zum Flavin O4 eine zu diesem Tryptophan aus (Abb. 1.3).^[25]

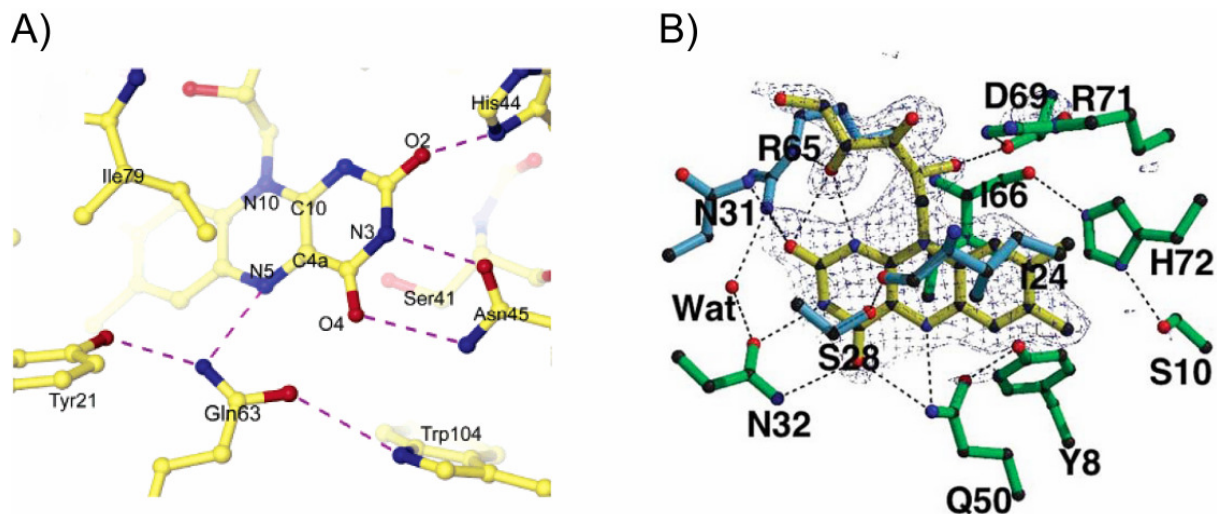


Abbildung 1.3: Flavinbindungstaschen zweier BLUF-Domänen. A) *R. sphaeroides* AppA (PDB ID: 1YRX) und B) *T. elongatus* TePixD BLUF-Domäne (PDB ID: 1XOP). Die AppA Bindungstasche repräsentiert die W_{in} und die des TePixD die W_{out} Konformation.^[25, 26]

1.2.2. Photozyklus und Signalweiterleitung der BLUF-Domänen enthaltenden Proteine

Eine charakteristische Eigenschaft aller BLUF-Domänen enthaltenden Proteine ist die blaublichtinduzierte Rotverschiebung, die den Signalzustand während des Photozyklus repräsentiert.^[22] Die Rotverschiebung entsteht möglicherweise gänzlich durch eine Neuordnung des Wasserstoffbrückennetzwerkes zwischen dem Flavinchromophor und den umgebenen Aminosäuren.^[25, 29-33] Der genaue Mechanismus des BLUF-Domänen Photozyklus ist jedoch bis heute nicht geklärt. Bestrahlung mit Blaulicht liefert zunächst einen angeregten FAD Zustand. Aus diesem angeregten Zustand bildet sich nach einem Elektronen- und Protonentransfer und dem damit verbundenen Bruch der Wasserstoffbrücken zwischen dem Glutamin 63 und dem Tyrosin 21, sowie dem Glutamin 63 und Flavin

N5-Atom der Signalzustand aus. Hierbei agiert das Tyrosin 21 als Elektronendonator und überträgt ein Elektron auf den Isoalloxazinring, so dass ein anionisches FAD-Radikal entsteht.^[15, 34, 35] Dieses FAD-Radikal abstrahiert als starke Base ein Proton vom Glutamin 63, welches wiederum ein Proton vom Tyrosin 21 abspaltet. Als Folge dieser Transferprozesse bildet sich ein FADH⁻-Tyr[•]-Radikalpaar aus. An dieser Stelle des BLUF-Domänen Photozyklus kann der Glutaminrest 63 nun entweder um 180° drehen und oder seine Imidsäuregruppe tautomerisieren.^[14, 15, 25, 27, 34, 36-42] Sowohl die Rotation als auch die Tautomerisierung des Glutamins 63 können möglicherweise durch einen Switch des Tryptophanrestes 104 von der W_{out} in die W_{in} Konformation oder umgekehrt gefördert bzw. begleitet werden.^[25, 41, 43] Hierbei wird durch den Wechsel des Tryptophans 104 von W_{out} nach W_{in} das Methionin 106 aus der Nähe des Flavins verdrängt.^[41, 43] Nach diesem Vorgang wird der Tyrosinrest reprotoniert, und eine neue Wasserstoffbrücke zwischen dem Tyrosin 21 und dem Glutamin 63 entsteht. Als letzten Schritt zur Ausbildung des Signalzustandes erhält der Glutaminrest 63 eine Wasserstoffbrücke von Flavin O4 und wird so neu verankert.^[37] Der erhaltene Signalzustand ist je nach BLUF-Domäne über einen Zeitraum von wenigen Sekunden bis Minuten stabilisiert und konvertiert wieder in den Grundzustand zurück (Abb. 1.4).^[20-22, 24, 32, 44, 45] Parallel zum Signalzustand kann sich aus einer langlebigeren angeregten FAD-Spezies durch *Intersystem Crossing* ein FAD-Triplettzustand ausbilden, der wieder direkt in den Grundzustand relaxiert.^[36, 46]

Ein ebenfalls publizierter Mechanismus beschreibt lediglich eine blaulichtinduzierte Dehnung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Glutamin 63, dem Tyrosin 21 und dem FAD O4-Atom. Diese Veränderung des Wasserstoffbrückennetzwerkes wird durch eine Änderung des Tryptophans 104 von der W_{out} in die FAD nahe W_{in} Konformation bedingt.^[19, 33, 47, 48]

Die lichtinduzierten, für die Ausbildung des Signalzustandes durchlaufenen Änderungen des Glutamins 63 und die sich auf dem β_4 - β_5 Loop bzw. β_5 -Strang befindlichen Tryptophan- 104 (in *K. pneumoniae* BlrP1: Threonin, *E. coli* YcgF: Alanin) und Methioninreste 106 bewirken nun ihrerseits eine Neuordnung in diesem Loop bzw. β_5 -Strang Bereich.^[14, 23, 49, 50] Verstärkt werden kann dieses Signal, wie im Fall der *R. sphaeroides* BlrP1 BLUF-Domäne, auch über zusätzliche Änderungen des Leucin 41 (AppA: Phe55), das sich in der Nähe des β_5 -Stranges befindet.^[23] Diese Umlagerungen des β_5 -Stranges und β_4 - β_5 Loops tangieren nun ihrerseits die in den C-terminalen Extensionen der BLUF-Domänen enthaltene $\alpha 4$ -Helix, die nun das Signal ähnlich den zuvor beschriebenen LOV-Domänen an die entsprechende Outputdomäne weitergeben kann.^[14, 23]

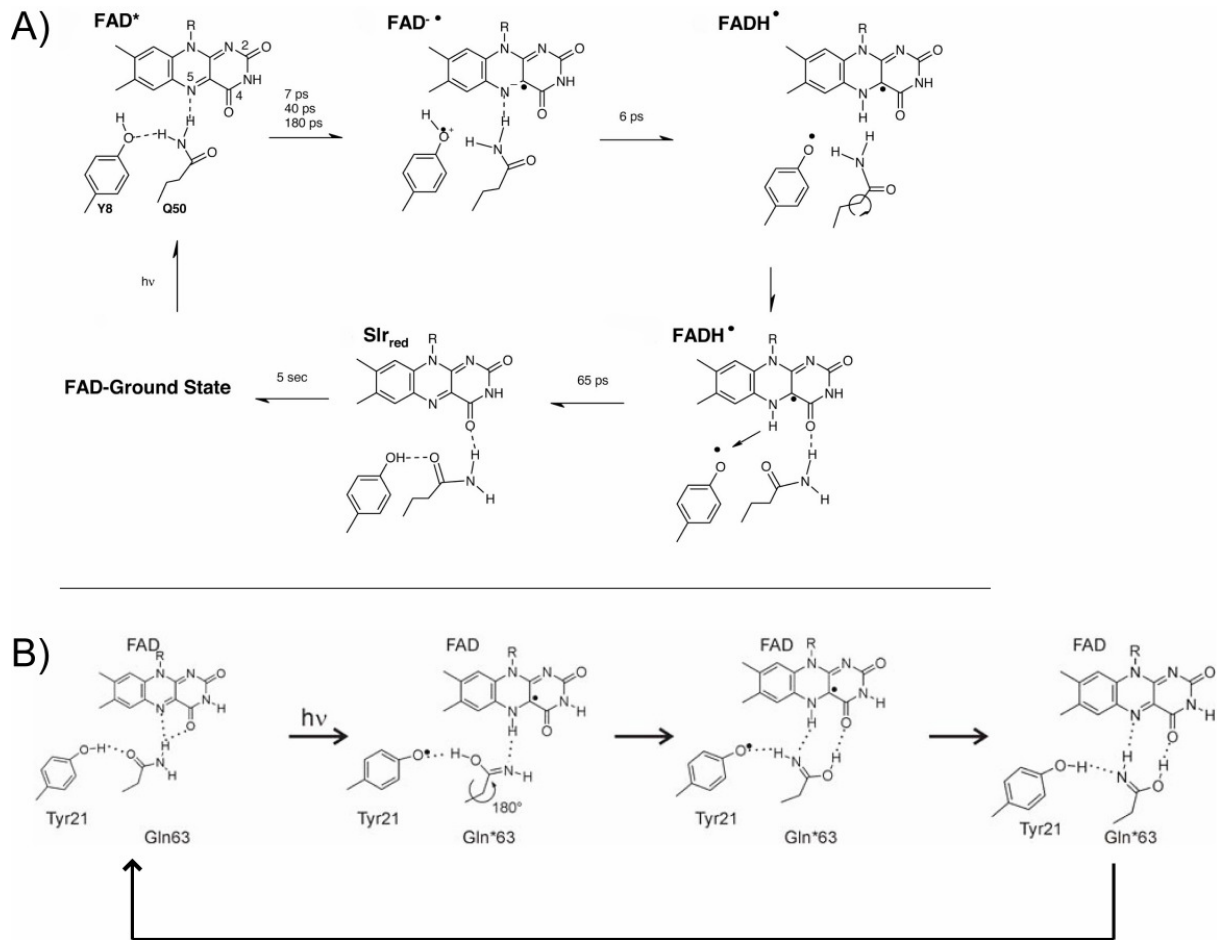


Abbildung 1.4: Photozyklen BLUF-Domänen enthaltender Proteine. A) Mechanismus über Drehung des Glutaminrestes 63 um 180° und B) Mechanismus einschließlich 180° Drehung und Tautomerisierung des Glutaminrestes 63.^[37, 41]

1.2.3. *E. coli* YcgF

Das *E. coli* YcgF ist ein interessantes Genprodukt, welches zwar im Genom des Darmbakteriums *E. coli* jedoch nicht in den eng verwandten Salmonellen vorhanden ist. Unter Blaulichtbestrahlung zeigten *E. coli* Bakterien eine Erhöhung ihrer Mobilitätsrate, ein Effekt, der in *ycgF-Deletions*-Mutanten und unter Lichtausschluss nicht beobachtet wurde.^[51] Das *E. coli* YcgF ist ein Blaulichtrezeptor bestehend aus einer N-terminalen BLUF-Domäne und einer C-terminalen EAL-Domäne, wobei die letztere Domäne an der Regulation der Biofilmbildung beteiligt ist. Ein vorwiegend α -helikaler Linkerbereich verbindet beide Domänen miteinander.^[45]

Untersuchungen zeigten eine Abhängigkeit der sensorischen Eigenschaften von der C-terminalen Länge des Blaulichtrezeptors. So liegen das *E. coli* YcgF und seine BLUF-Domäne in Verbindung mit der C-terminalen Linkerhelix J α (YcgF-(1-137) in Lösung als

Dimer vor, während die BLUF-Domäne ohne Linkerhelix (YcgF-(1-113)) einen tetrameren oder pentameren Oligomerisierungszustand aufweist.^[14, 45]

Durch Rekonstitution der YcgF BLUF-Domäne sowohl mit dem nativem Chromophor FAD als auch mit FMN und Riboflavin konnte gezeigt werden, dass der Photozyklus am Isoalloxazinring abläuft und der AMP-Anteil lediglich zur Stabilisierung des Blaulichtrezeptors beiträgt. Hierbei zeigten alle *E. coli* BLUF-Domänen die blaulichtinduzierte charakteristische Rotverschiebung und konvertierten mit Halbwertzeiten im Minutenbereich in den Dunkelzustand zurück. Ausgeschlossen werden konnte ebenso eine chromophorbedingte Veränderung im Faltungsverhaltens der Sekundärstrukturelemente.^[45, 52]

Die *E. coli* YcgF BLUF-Domäne weist jedoch einige photochemischen Besonderheiten im Vergleich zu den SyPixD, TePixD, BlrB und AppA BLUF Photorezeptoren auf. Zu diesen gehören sowohl ein im dunkel- als auch lichtadaptiertem Zustand beobachtetes blauverschobenes Absorptionsmaximum bei 461 bzw. 465 nm, eine kleinere blaulichtinduzierte Rotverschiebung und ein stark stabilisierter Signalzustand (Tab. 1.1).^[19-23, 29, 45, 47, 52] Einzig die AppA BLUF-Domäne besitzt einen lichtadaptierten Zustand, der mit einer Halbwertzeit von 15 min ähnlich der YcgF-(1-137) BLUF-Domäne stabilisiert zu sein scheint.^[30]

BLUF-Domäne	Absorptionsmaximum dunkel- / lichtadaptierter Zustand	Rotverschiebung	Halbwertzeit der Dunkelkonversion
YcgF-(1-137)	461 nm / 465 nm	4 nm	14 min 42 s
AppA	445 nm / 460 nm	15 nm	15 min
SyPixD	443 nm / 457 nm	14 nm	5 s
TePixD	438 nm / 448 nm	10 nm	25 s
BlrB	450 nm / 460 nm	10 nm	5 s
BlrP1	452 nm / 462 nm	10 nm	28 s

Tabelle 1.1: Zusammenfassung der photochemischen Eigenschaften der *E. coli* YcgF, *Synechocystis* sp. SyPixD, *T. elongatus* TePixD, *R. sphaeroides* BlrB und *R. sphaeroides* AppA BLUF-Domänen^[19-23, 29, 30, 45, 47]

Des Weiteren besitzt die C-terminale Linkerhelix einen stabilisierenden Einfluss auf den Signalzustand, der sich in einer deutlichen Erhöhung der Halbwertzeiten manifestiert.^[45] Ebenfalls zeigen ¹H und ¹H,¹⁵N NMR-Spektren der YcgF-(1-137) BLUF-Domäne globale lichtinduzierte strukturelle Änderungen, die auch für das *K. pneumoniae* BlrP1 und die *Avena*

sativa LOV2 Domäne beobachtet wurden (Abb. 1.5). Die im Gegensatz zu den AppA und BlrB BLUF-Domänen vorliegenden umfassenden lichtgetriggerten Änderungen zeigen, dass die Übertragung des Blaulichtsignals zur Effektdomäne im YcgF über einen anderen Mechanismus abläuft, z.B. ohne die Umlagerung des Tryptophan 104, an dessen Stelle in der *E. coli* BLUF-Domäne ein Alaninrest vorliegt. Die globalen strukturellen Änderungen repräsentieren lichtinduzierte Veränderungen der C-terminalen α -helikalen Verlängerung, die auf diese Weise das Blaulichtsignal von der Flavinumgebung auf die EAL-Effektdomäne übertragen kann.^[11, 12, 23, 45]

Aufgrund der umfassenden strukturellen Änderungen zwischen den licht- und dunkeladaptierten Zuständen konnte eine hohe Aktivierungsenergie von mind. 89 kJ/mol beobachtet werden. Diese kinetische Barriere entspricht einer Verdopplung der Zerfallsraten des lichtadaptierten Zustandes bei einer Temperaturerhöhung von 6 K (Abb. 1.6). Daher wurde für den YcgF BLUF-Blaulichtrezeptor auch eine Aktivität als Temperatursensor postuliert.^[16, 45]

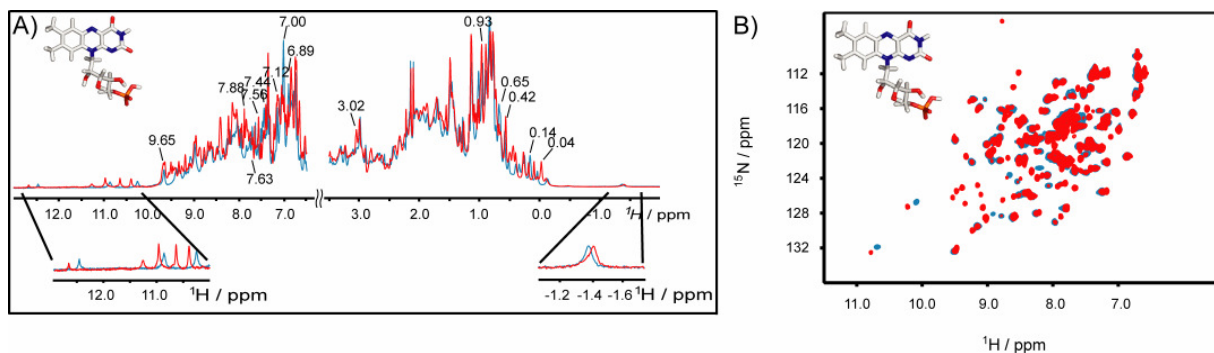


Abbildung 1.5: NMR Spektren der mit FMN rekonstituierten *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domäne. A) ^1H NMR- und B) $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ HSQC-Spektrum des dunkel- (blau) und lichtadaptierten (rot) Blaulichtrezeptors.^[45]

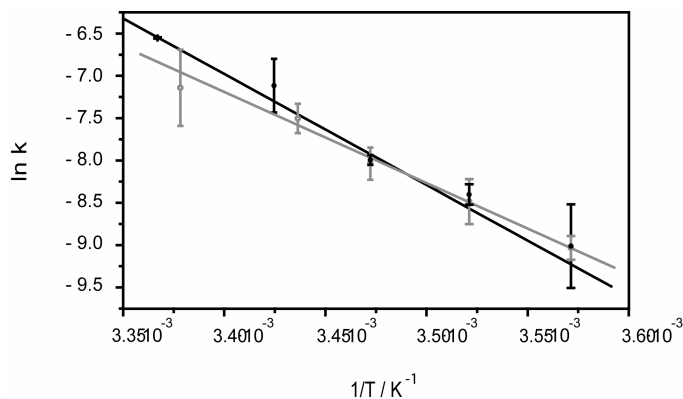


Abbildung 1.6: Arrheniusplots der Dunkelreversion der mit FMN rekonstituierten *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domäne. Die Halbwertszeiten wurden UV/VIS- (schwarz) und NMR-spektroskopisch (grau) bestimmt.^[45]

Die *E. coli* YcgF EAL-Domäne agiert als Antirepressor und reguliert auf diese Weise die Biofilmbildung und nicht, wie die EAL-Domäne vom *K. pneumoniae* BlrP1 als Phosphodiesterase, die das c-di-GMP einen sekundären Botenstoff hydrolysiert. YcgF agiert hierbei als Antagonist des Repressors YcgE und bindet blaulichtinduziert an seine N-terminale MerR-ähnliche Domäne (Mercury Resistance). Infolgedessen löst sich der YcgE/YcgF-Komplex von der Operatorbindungsstelle der DNA ab, so dass acht Proteine (YcgZ, YmgA, YmgB, YmgC, YliL, YnaK, Bdm und YbgS) exprimiert werden können, die ihrerseits Prozesse zum Biofilmbau in Gang setzen (Abb. 1.7).^[16]

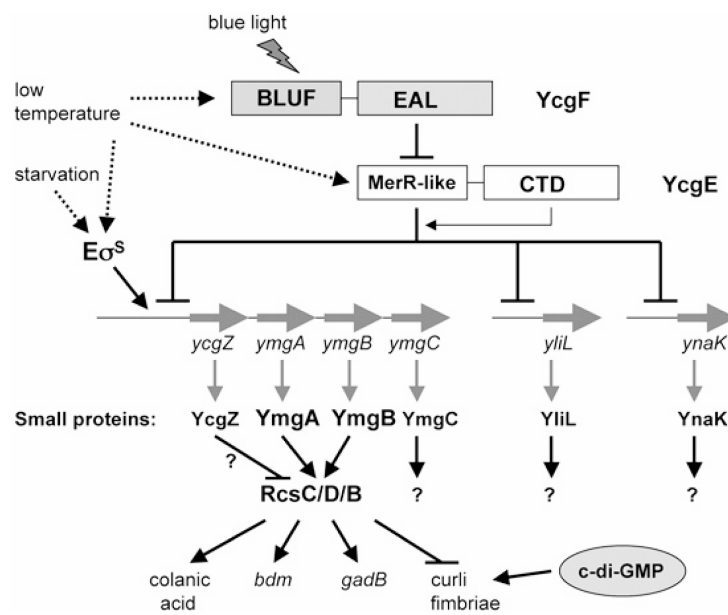


Abbildung 1.7: Modell für das durch YcgF/ YcgE kontrollierte Proteinnetzwerk.^[16]

1.3. Photolyase / Cryptochrom Familie

1.3.1. Schädigung der DNA

In pro- und eukaryotischen Organismen sind die Erbinformationen durch helikal gewundene DNA-Doppelstränge kodiert, die aus den vier Nukleosiden Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin aufgebaut sind. Diese gehen unter Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Adenin und Thymin, sowie Cytosin und Guanin jeweils Watson-Crick-Basenpaarungen ein.^[53]

In der Zelle können unterschiedliche exogene und endogene Faktoren, z.B. chemische Agenzien, reaktive Sauerstoffspezies oder ionisierende und UV-Strahlung Schäden in der DNA verursachen. Bei den DNA-Schäden kann es sich um Alkylierungen, Desaminierungen,

Dimerschäden, Einzel- und Doppelstrangbrüche oder sogar DNA-Proteinvernetzungen handeln. Diese Veränderungen können zum Abbruch der DNA-Replikation und zum Einbau eines falschen Nukleotids in den Tochterstrang während der Replikation führen sowie die Regulation der Genexpression beeinträchtigen. Mutierte DNA-Stränge können so eine fehlerhafte Codierung von Proteinen und biologisch aktiven RNA-Spezies bewirken.^[54] Daher führen veränderte Erbinformationen meist zu einer Beeinträchtigung der Zellfunktionen oder sogar zum Zelltod. Um diese Veränderungen der Erbinformationen zu beheben, besitzt die Zelle verschiedene Reparaturmechanismen. Zu diesen zählen unter anderem die Basen- und Nukleotidexzisionsreparatur (BER und NER), die Fehlpaarungsreparatur, die homologe Rekombination und die durch DNA-Photolyasen ausgeführte Photoreaktivierung.^[8, 55-58]

1.3.2. Schädigung der DNA durch UV-Strahlung

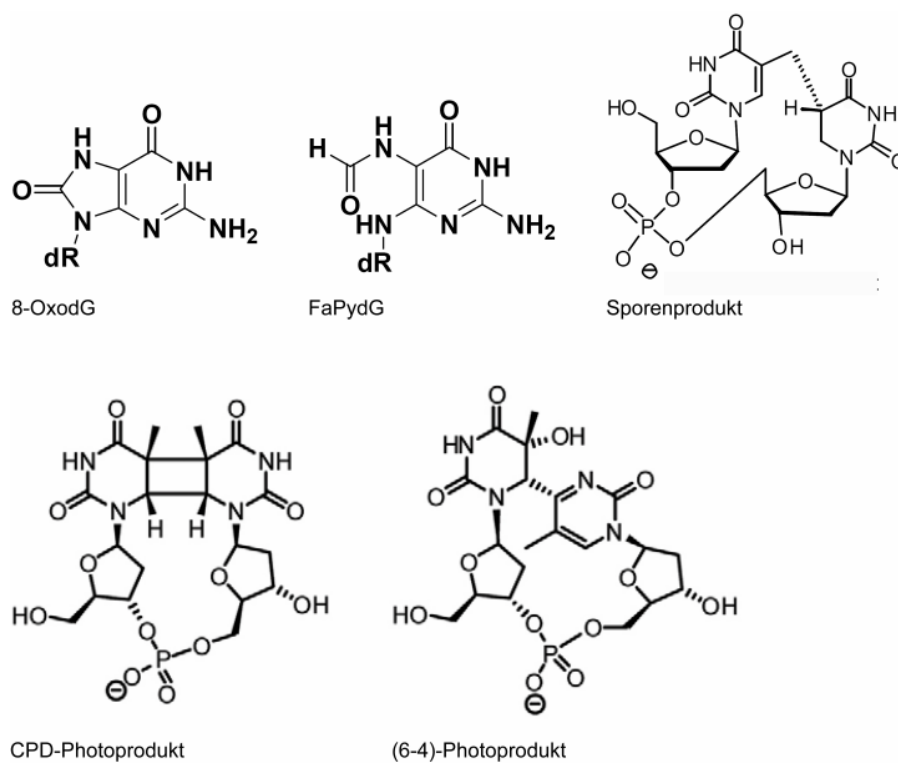


Abbildung 1.8: UV-induzierte DNA-Schäden.

UV-Strahlung wird entsprechend ihrer Energie in drei Bereiche unterteilt: UV-A (400-320 nm), UV-B (320-290 nm) und UV-C Strahlung (290-100 nm). Da die aromatischen Nukleotidbasen ein Hauptabsorptionsmaximum bei 260 nm besitzen, ist die DNA der meisten auf der Erde lebenden Organismen in hohem Maße anfällig gegenüber der energiereichen UV-C Strahlung. Photoschäden können hierbei direkt durch UV-C Strahlung

oder indirekt durch UV-A und UV-B induzierten oxidativen Stress gebildet werden. Auf diese Art entstehen CPD- und (6-4)-Photoprodukte, 8-oxo-7,8-Dihydroguanin-Schäden (8-OxodG), das Formamidopyrimidin des Guanins (FaPydG) und Sporenprodukte (Abb. 1.8).^[59, 60]

1.3.3. CPD- und (6-4)-Photoprodukte

Die durch UV-Strahlung induzierten Hauptschäden in der DNA sind zu ~ 80 % Cyclobutanpyrimidindimere (CPD) und zu ~ 20 % Pyrimidin-(6-4)-Pyrimidon Photoprodukte (Abb. 1.9).^[61, 62] Beide Schäden behindern die Transkription und Replikation^[63] bzw. sind Hauptursachen für Mutagenesen, Karzinogenesen, führen zum Zellzyklusarrest, induzieren die Apoptose und sind somit für Hautkrebs und Photoalterung verantwortlich.^[64-66]

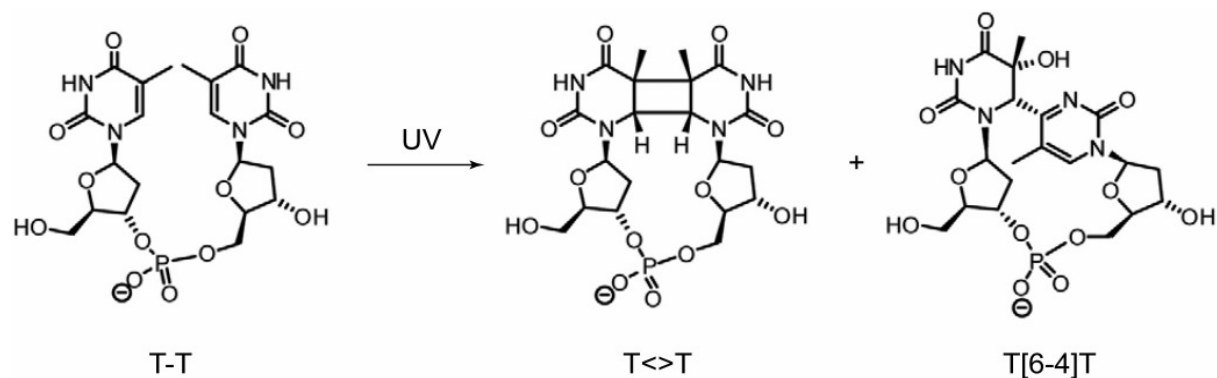


Abbildung 1.9: Durch UV-Strahlung induzierte CPD- und (6-4)-DNA-Photoschäden. Dargestellt sind die Schäden zwischen zwei benachbarten Thyminen.^[8]

CPD-Schäden entstehen durch photochemisch induzierte [2+2]-Cycloadditionen zwischen zwei benachbarten Pyrimidinbasen eines DNA-Stranges. Im Verlauf dieser Reaktion werden beide Basen zwischen ihren C5- und C6-Atomen kovalent miteinander verbunden. Das Thymindimer (T<>T) kommt in der Natur mit ca. 90 % am häufigsten vor, wohingegen die anderen Kombinationen T<>C, C<>T, C<>C in deutlich geringeren Mengen beobachtet werden.^[67] Hierbei werden in doppelsträngiger DNA hauptsächlich die cis-syn Konformation und in einzelsträngiger DNA cis-syn und trans-syn CPD-Dimere ausgebildet.^[8, 68]

Die photochemische Bildung der (6-4)-Photoprodukte erfolgt über eine Paterno-Büchi-Reaktion, bei der zunächst zwischen der C5/C6-Doppelbindung des ersten und der C4-Carbonylgruppe des zweiten Thymins ein Oxetanintermediat ausgebildet wird. Dieses Oxetanintermediat reagiert direkt weiter zum stabileren (6-4)-Photoprodukt. Entstandene

(6-4)-Photoprodukte werden unter Bestrahlung mit Licht im Bereich von 300–350 nm fast vollständig in das Dewar-Isomer konvertiert (Abb. 1.10).^[69-71]

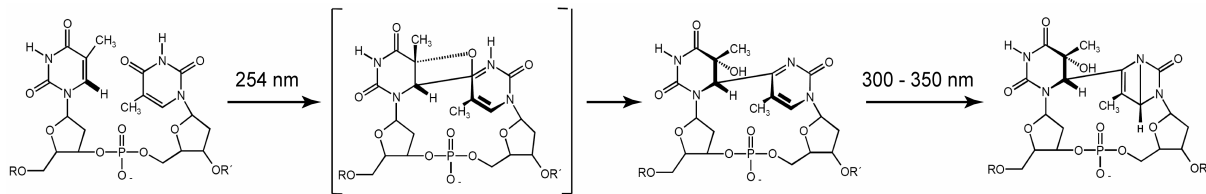


Abbildung 1.10: Bildung des (6-4)-Photoproduktes.

1.3.4. DNA-Photolyasen

Die in der DNA auftretenden CPD- und (6-4)-Photoschäden können durch Photolyasen über den Photoreaktivierungsmechanismus repariert werden.

Die Klassifizierung dieser Enzyme in CPD- und (6-4)-DNA-Photolyasen erfolgt nach ihrer Reparaturspezifität für den jeweiligen DNA-Photoschaden. Erstere lassen sich basierend auf ihrer Sequenzähnlichkeiten weiter in Klasse I, II und III CPD-Photolyasen unterteilen. Klasse I CPD-Photolyasen kommen in mikrobiellen Organismen, wie Eubakterien, Pilzen und Haloarchaeen, Klasse II Enzyme Archaeen, Viren und in höheren Organismen, wie Algen, Pflanzen und Tieren (mit Ausnahme von Säugetieren) und Klasse III Reparaturenzyme, eine Schwesterklasse der pflanzlichen Cryptochrome, in Bakterien vor.^[71-73] (6-4)-Photolyasen konnten ebenfalls in höheren Organismen, wie z.B. *Arabidopsis thaliana*, *Drosophila melanogaster*, *Xenopus laevis*, *Danio rerio*, *Dunaliella salina* und *Aphrocallistes vastus* gefunden werden.^[74-79]

1.3.4.1. Aufbau

Photolyasen sind monomere Blaulichtrezeptoren, die einen katalytischen Kofaktor und einen Antennenkofaktor enthalten. Beide Kofaktoren sind nichtkovalent gebunden. Als essentiellen katalytischen Kofaktor weisen alle Photolyasen FAD auf, während die Enzyme als Antennenkofaktor MTHF, 8-HDF, FAD oder FMN besitzen können (Abb. 1.11).^[80-84] Der essentielle FAD-Kofaktor wird in Photolyasen für die DNA-Bindung und DNA-Reparatur benötigt. Die aktive Form des katalytischen Kofaktors ist der durch zwei Elektronen reduzierte FADH⁻-Zustand. Antennenkofaktoren hingegen sind für die Reparaturaktivität nicht notwendig, können diese jedoch aufgrund ihrer höheren Extinktionskoeffizienten und

langwelligeren Absorptionsmaxima, im Vergleich zur aktiven reduzierten FADH⁻-Form, steigern.^[8]

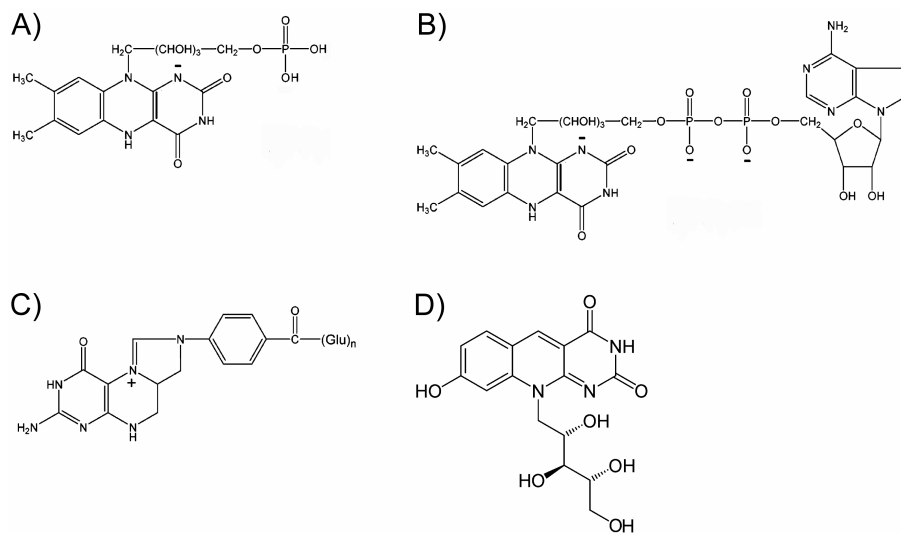


Abbildung 1.11: Verschiedene in Photolyasen vorkommende Antennenkofaktoren. A) FMN, B) FAD, C) MTHF, D) 8-HDF.

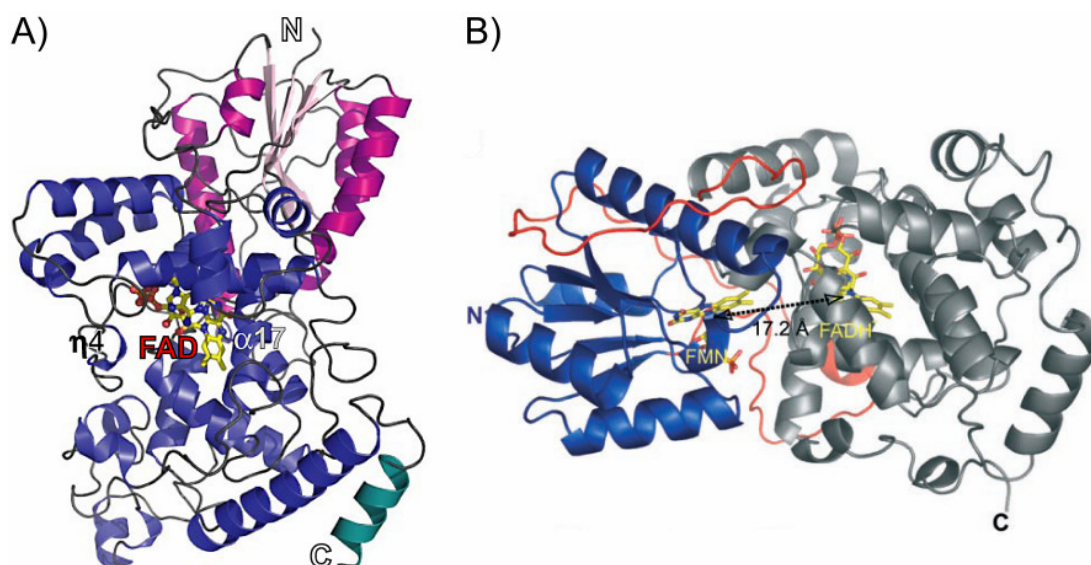


Abbildung 1.12: Kristallstrukturen der A) *A. thaliana* (6-4)-DNA-Photolyase (PDB ID: 3FY4) und der B) *T. thermophilus* Klasse I CPD-DNA-Photolyase (PDB ID: 2JO9).^[84, 85]

Alle Photolyasen bestehen aus einer N-terminalen Photolyasedomäne und einer C-terminalen FAD-Bindungsdomäne, welche die substratspezifische Bindungstasche enthält. Beide Domänen sind durch einen Interdomänenloop, der sich um die N-terminale-Domäne windet, miteinander verbunden. Die N-terminale Photolyasedomäne weist eine α/β Rossmanfaltung

mit einem 5 strängigem parallelem β -Faltblatt auf und ist verantwortlich für die Bindung der verschiedenen Antennenkofaktoren. Die größere C-terminale α -helikale FAD-Bindungsdomäne bindet den katalytischen Kofaktor in der für Photolyasen charakteristischen U-Form, die den Isoalloxazinrest und den Adeninring in räumliche Nähe bringt (Abb. 1.12). Das Flavin befindet sich hierbei tief in der α -helikalen Domäne und ist über eine kleine Öffnung in der Mitte der Bindungsdomäne von der Oberfläche aus zugänglich.^[8, 71, 73, 86]

1.3.4.2. Photoaktivierung

Die katalytisch aktive FADH⁻-Form wird durch einen photochemischen Prozess, genannt Photoaktivierung, generiert.^[87-89] Hierbei werden Elektronen von einem exogenen Donor auf das FAD übertragen.^[90] Nach Absorption von Blaulicht bildet sich zunächst FAD_{ox} oder FADH^{*} im angeregten Zustand, welches ein Elektron von einem ihm benachbarten Tryptophan 382 (nach *E. coli* Photolyase) abstrahiert. Dieses Tryptophan abstrahiert seinerseits ein Elektron vom Tryptophan 359 und dieses vom Tryptophanrest 306, der zur Stabilisierung des reduzierten FAD-Kofaktors ein Proton an das Lösungsmittel abgibt.^[91] Der Elektronentransfer über die Tryptophantriade läuft hierbei über einen Zeitraum von wenigen Pikosekunden ab, wohingegen die Deprotonierung des äußeren Tryptophans im Bereich von ~ 200 ns liegt (Abb. 1.13).^[92, 93] Die für die Photoaktivierung benötigten Tryptophanreste sind in allen Photolyasen vorhanden. In der *X. laevis* (6-4)-Photolyase konnte jedoch durch tr-EPR-spektroskopisch nach 100 ns ein Tyrosyl-Radikal beobachtet werden. Demnach scheint in (6-4) Photolyasen ein Tyrosinrest als letzter Elektronendonator zu fungieren.^[71, 94]

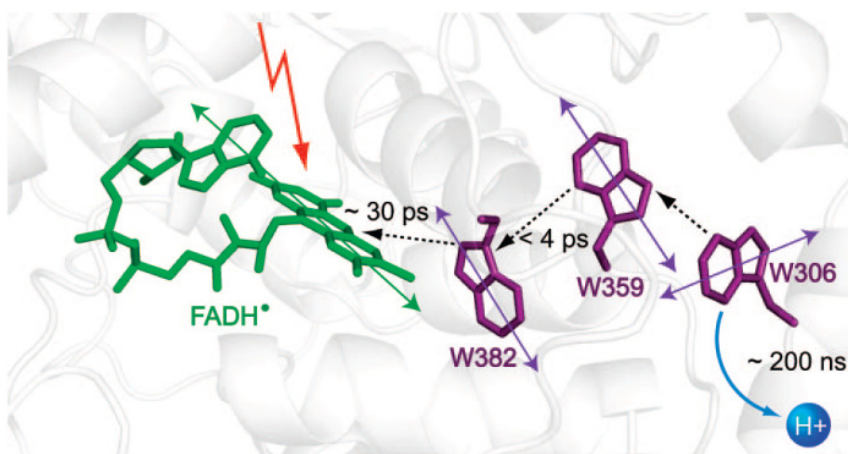


Abbildung 1.13: Anordnung der FADH^{*}-W382-W359-W306 Kette in der *E. coli* DNA-Photolyase (PDB ID: 1DNP15) und Schema der Elektron- und Protontransferreaktionen.^[93]

Für die *E. coli* CPD-Photolyase wurde ein alternativer Elektronentransferweg diskutiert, dessen physiologische Bedeutung bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht geklärt wurde. In diesem könnte die Photoreduktion des katalytischen FAD auch über *Elektronen-Hopping* entlang der $\alpha 15$ Helix und dem Phenylalaninrest 366 stattfinden.^[95]

1.3.5. DNA-Bindung der (6-4)- und CPD-DNA Photolyasen

DNA Photolyasen erkennen Schäden mit sehr geringen Dissoziationskonstanten im Bereich von $1 \cdot 10^{-9}$ M.^[72, 75, 96, 97] Diese DNA-Bindung ist unabhängig vom Redoxzustand des FAD.^[98, 99] Im Gegensatz zur geschädigten DNA wurden für die unspezifische DNA-Bindung sehr viel höhere Dissoziationskonstanten im Bereich von $1 \cdot 10^{-4}$ M beobachtet.^[96]

Photolyasen erkennen, im Gegensatz zu sequenzspezifischen Proteinen, die durch den jeweiligen Schaden verursachte Veränderung des DNA-Phosphodiesterückgrats und die Struktur des Schadens selbst.^[96, 100, 101] So verursachen z.B. CPD-Schäden einen Knick von 20 bis 30 ° zur großen Furche hin.^[102] Im Verlauf des Bindungsvorgangs flippt die Photolyase den Schaden in ihr aktives Zentrum der N-terminalen Photolyasedomäne. Hierbei winden CPD-Photolyasen den CPD-Schaden um 50 ° aus dem Doppelstrang heraus.^[103] Die entstandene Lücke wird in CPD-Reparaturenzymen durch die Aminosäurereste von G397 bis F406 (*A. nidulans* CPD-Photolyase) ausgefüllt, von denen Prolin 402 unspezifische van der Waals Kontakte zu den Adeninen des Gegenstranges und Leucin 403 eine Wasserstoffbrücke zum P^0 Phosphat zwischen diesen beiden Adeninen ausbildet.^[103] In (6-4)-DNA Photolyasen wird die Ausbuchtung ebenfalls über mehrere Aminosäurereste, vor allem durch den hochkonservierten Argininrest 421 (*D. melanogaster* (6-4)-Photolyase), stabilisiert. Das Arginin 421 ragt in den Duplex hinein und wechselwirkt mit den Phosphaten P^0 und P^{+1} des geschädigten Stranges über die Ausbildung von Salzbrücken. Auf ähnliche Weise interagieren Lysin 431 und Serin 424 mit dem P^{+2} Phosphat desselben Stranges und Lysin 161 und Arginin 502 mit dem Phosphatrückgrat des ungeschädigten Stranges.^[104] Auf analoge Weise bildet in CPD-Photolyasen der Argininrest 350 eine für die DNA-Bindung wichtige Salzbrücke zum P^{+1} jedoch nicht zum P^0 Phosphat aus.^[103, 105] In der Nähe dieses P^0 Phosphats (der verbrückenden Formacetalgruppe) konnte im CPD-Photolyase-DNA-Komplex keine Aminosäure beobachtet werden. Salzbrücken werden von den Resten Glutamin 411 und Lysin 414 zu den P^{+2} Phosphaten des geschädigten Stranges formiert.^[103] Zusätzlich können CPD-Photolyasen über das Dipolmoment von α -helikalen ($\alpha 6$ und $\alpha 18$) Segmenten den Protein-DNA-Komplex elektrostatisch stabilisieren.

Nach der Bindung kann der Photoschaden aufgrund seiner räumlichen Nähe über seine beiden C4 Carbonylgruppen Wasserstoffbrücken zur N6 Aminogruppe des FAD-Adeninanteils ausbilden.^[103, 104]

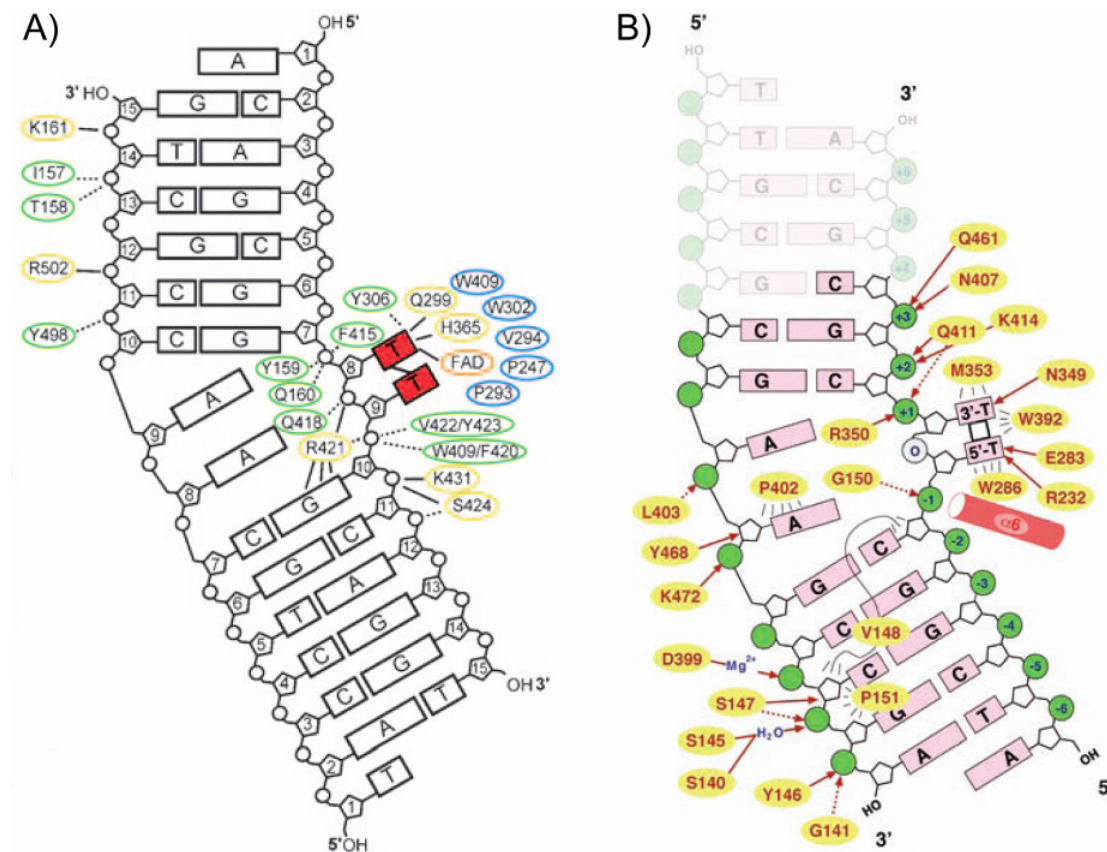


Abbildung 1.14: Schematische Darstellung der Photolyase-DNA-Wechselwirkungen. A) *D. melanogaster* (6-4)-Photolyase und B) *A. nidulans* CPD-Photolyase.^[103, 104]

Der Photoschaden befindet sich sowohl im CPD- als auch im (6-4)-Enzym in einem überwiegend hydrophoben Bereich und ist in diesem von zwei Tryptophanresten umgeben, die über π - π -Stapelwechselwirkungen mit den geschädigten Basen interagieren. Darüber hinaus sind die Tryptophanreste in der Lage, die während des Reparaturmechanismus generierte hochreaktive Radikalanionspezies effektiv abzuschirmen.^[103-105] Des Weiteren bildet das 3'-Pyrimidin des CPD-Schadens Wasserstoffbrücken zum Asparagin 349 und das 5'-Pyrimidin zu dem Glutamatrest 283 aus. Im Gegensatz dazu bestehen in (6-4)-Photolyasen Wasserstoffbrücken zwischen dem Glutamin 299 und dem N3- und O2-Atomen des 3'Pyrimidins und zwischen dem hochkonservierten Histidin 365 und der C5-Hydroxylgruppe des gleichen Pyrimidins.^[104] Die Ausbildung dieser Wasserstoffbrückenbindungen ist in beiden Enzymen wichtig für die katalytische Reparatur des jeweiligen DNA-Schadens. Im Verlauf des CPD-Reparaturmechanismus kann der protonierte Glutamatrest 283 das durch

den Elektronentransfer vom FADH^- ausgebildete Radikalanion des CPD-Schadens stabilisieren.^[103, 104] In (6-4)-Photolyasen protoniert der Histidinrest 365 die C5-OH Gruppe des 3'-Pyrimidins, so dass dieses im nächsten Schritt ein Wassermolekül abspalten kann. In CPD-Photolyasen sind zudem noch der mit 3' Thymin interagierende Methioninrest 353 und der zum 5' Thymin Wasserstoffbrückenbindungen ausbildende Argininrest 322 an der Bindung des Photoschadens beteiligt (Abb. 1.14).^[103]

Diese beschriebenen Unterschiede des aktiven Zentrums und die Art der Wechselwirkungen der an der DNA-Bindung beteiligten Aminosäurereste erklären die Spezifität der CPD-Enzyme für den CPD-Schaden und der (6-4)-Photolyasen für das (6-4)-Photoprodukt.

1.3.6. Reparaturmechanismen

1.3.6.1. CPD-Reparaturmechanismus

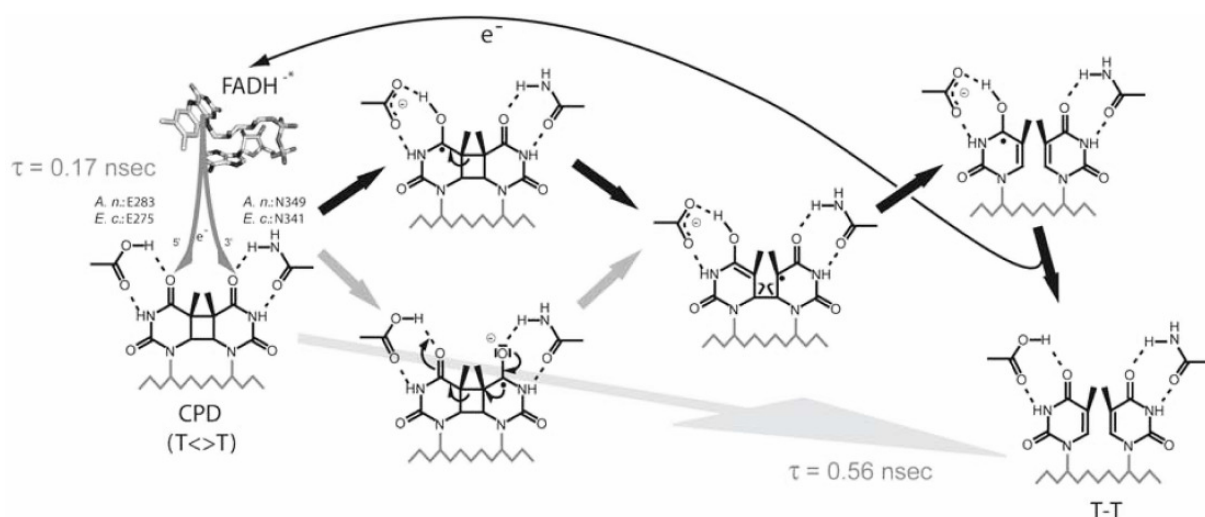


Abbildung 1.15: Möglicher Reparaturmechanismus der CPD-DNA-Photolyasen, in dem das CPD-Radikalanion durch den Glutamatrest 283 stabilisiert oder protoniert werden kann.^[73]

Der Reparaturmechanismus der CPD-Photolyasen ist wie auch der (6-4)-Mechanismus ein photonengetriebener zyklischer Elektronentransfer. In einem lichtunabhängigen Prozess bindet zunächst die Photolyase die CPD-haltige DNA und bildet einen stabilen Enzym-Substrat-Komplex aus, in dem das Cyclobutanpyrimidindimer aus dem DNA-Doppelstrang heraus und in das aktive Zentrum des Blaulichtrezeptors gedreht ist.^[103, 106] Im nächsten Schritt absorbiert der Antennenkofaktor ein Photon ($\lambda = 320 - 500 \text{ nm}$) und überträgt diese Excitationsenergie via Förster-Transfer auf den katalytischen vollständig reduzierten FAD-

Kofaktor. Der angeregte FADH^* -Kofaktor wiederum transferiert über seinen Adenosinanteil ein Elektron auf das zu reparierende Pyrimidindimer, infolge dessen sich ein Radikalanion ausbildet, das durch den Glutamatrest 283 entweder stabilisiert oder protoniert werden kann. Im nächsten Schritt spalten sich die C5-C5- und die C6-C6-Bindungen in einem asynchronen Mechanismus. Nach der Trennung der beiden Pyrimidine wird das Elektron auf das FADH^* zurück übertragen, wieder FADH^* ausgebildet, und die DNA dissoziiert wieder vom Enzym ab (Abb. 1.15). Auf diese Weise schließt sich der katalytische Zyklus.^[8] Aufgrund des über mindestens 25 Zyklen ablaufenden Rückelektrotransfers zum FADH^* können CPD-Photolyasen den CPD-Schaden mit Quantenausbeuten von bis zu 98 % reparieren.^[88, 107]

1.3.6.2. (6-4)-Reparaturmechanismus

Für (6-4)-DNA-Photolyasen wurde anhand der Kristallstruktur eines Komplexes bestehend aus der Photolyase und dem (6-4)-Schaden ein neuer Reaktionsmechanismus postuliert.^[104] Dieser Mechanismus läuft nicht über die Ausbildung eines Oxetanintermediats ab.^[108]

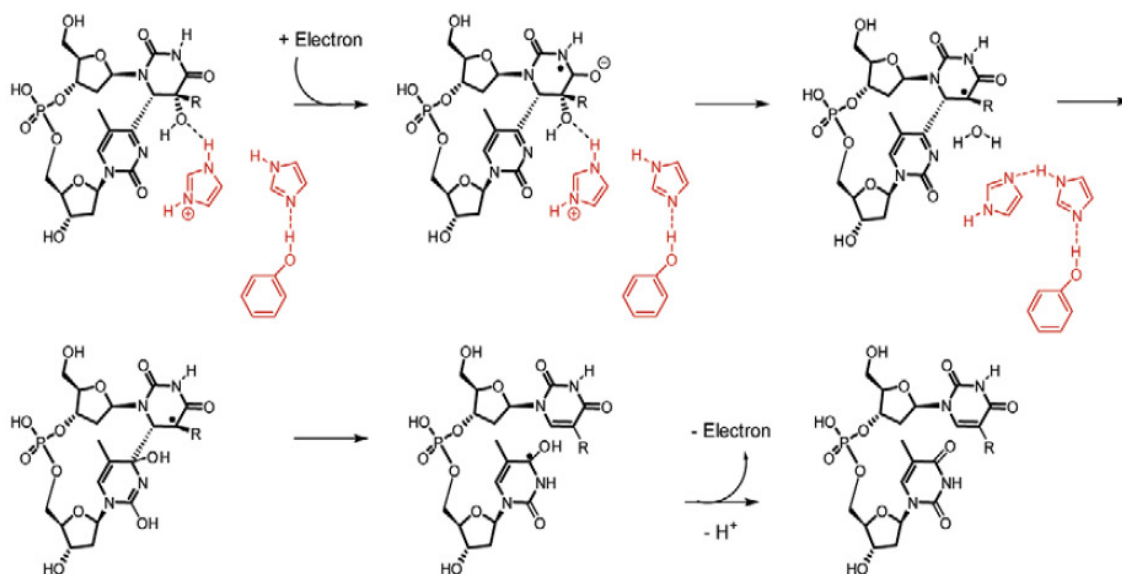


Abbildung 1.16: Möglicher Reparaturmechanismus der (6-4)-DNA-Photolyasen.^[86, 104]

Nach der Bindung des DNA-Stranges wird der (6-4)-Schaden um fast 180° in das aktive Zentrum des Enzyms gedreht. Blaublichtaktivierung (300 - 500 nm) des Antennenkofaktors oder des reduzierten katalytischen FAD-Kofaktors direkt induziert die Ausbildung der angeregten Zustände. Im nächsten Schritt kann die Energie über den Förster-Dipol-Dipol-Transfer vom Antennenchromophor auf das FADH^* übertragen werden. Das FADH^* überträgt ein Elektron auf den (6-4)-Schaden und ein Pyrimidin-Radikalanion entsteht. Im Anschluss protoniert der Histidinrest 365 die C5-OH Gruppe dieses Pyrimidin-

Radikalanions, so dass es ein Wassermolekül abspaltet. Dieses Wassermolekül greift nun das Acylimin an, infolgedessen sich ein weiteres Radikal ausbildet, das schnell in zwei reparierte Pyrimidinreste zerfällt. Letztendlich wird das Proton wieder abstrahiert und das Elektron zurück zum FADH[•] transferiert (Abb. 1.16).^[104] Jedoch ist dieser Rückelektronentransfer von der DNA zum (6-4)-Enzym aufgrund einer relativ stark ausgebildeten Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Photolyase und dem FAD N5-H und der daraus resultierenden Verringerung des FADH[•]-Redoxpotentials erschwert.^[109] Demnach muss zur erneuten Aktivierung des FAD-Kofaktors wieder ein Photon absorbiert werden, was eine Erklärung für die geringen Quantenausbeuten von 5 bis 10 % im Fall der (6-4)-Photolyasen liefert.^[75]

1.3.7. Die *A. thaliana* (6-4)-Photolyase

Die pflanzliche *A. thaliana* (6-4)-DNA-Photolyase ist wie alle Photolyasen ein monomeres Enzym. Die aufgereinigte Photolyase liegt in einer Mischung aus oxidiertem und neutralem semichinoidem Zustand vor, die jedoch innerhalb 48 h vollständig aufoxidiert. Ebenso konnte gezeigt werden, dass diese Photolyase den (6-4)-Schaden erkennt und repariert.^[78, 109]

Das (6-4)-Enzym besitzt neben dem aktiven Zentrum, der Kofaktorumgebung und dem Tryptophan-Elektronen-Transfer-Weg (W406, W383, W329) weitere Charakteristika wie eine Phosphatbindungsstelle (D235-A256), ein überstehendes PLK Motiv (Y282-L300), einen Schwefel-Loop (M318-C324) und eine den Cryptochromen ähnliche C-terminale α -Helix (α 22-Helix: D508-D522).^[85] Nachfolgend werden diese Motive kurz vorgestellt und ihre eventuelle Funktion beschrieben.

Die in der Phosphatbindungsstelle an der Bindung des Phosphations über Wasserstoffbrücken beteiligten Glutamat- 243 und Tryptophanreste 238 befinden sich auf einer 3_{10} -Helix. Die Phosphatbindungsstelle beschränkt den Zugang zur DNA-Bindungstasche, so dass durch die Phosphatbindung entstehende konformationelle Änderungen indirekt die FAD-Redoxeigenschaften und das (6-4)-Bindungsverhalten steuern können.

Das PLK Motiv ersetzt eine in anderen Photolyasestrukturen vorkommende α -Helix. Es beginnt mit einem lysinreichen flexiblen Loop, gefolgt von zwei zentralen cis-peptidverknüpften Prolinresten (Pro290 und Pro291) und endet mit einer hydrophoben Oberflächenklappe, die auf Leucin 296 zentriert ist. In der *A. thaliana* (6-4)-Photolyase schränkt das PLK-Motiv den Zugang zur FAD-Substratbindungsstelle ein, und könnte

gemeinsam mit dem Phosphatbindungsmotiv als Oberflächensignal für Kernlokalisierung des Enzyms fungieren bzw. die FAD-Eigenschaften regeln.

Der Schwefel-Loop ragt zwischen dem FAD und dem C-terminus hervor und befindet sich somit nahe der für den Elektronentransfer benötigten Tryptophan-Triade. Die Methionin- und Cysteinreste am Anfang und Ende dieses Motivs können in der pflanzlichen (6-4)-Photolyase Wasserstoffbrücken zum Tryptophan 329 und Tryptophan 383 ausbilden und so den Elektronentransfer beeinflussen.^[85]

1.3.8. Die *D. salina* (6-4)-Photolyase

D. salina ist eine einzellige photosynthetisch aktive Mikroalge, die große Mengen an Carotinoiden produziert. Die Algen können in salinen Gebieten überleben, da sie in der Lage sind, ihre intrazelluläre Glycerinkonzentration an die umgebende Salzkonzentration anzupassen. Auf diese Weise können die Mikroalgen den für ihr Überleben erforderlichen osmotischen Druck erzeugen.^[110]

Die (6-4)-DNA-Photolyase aus *D. salina* ist kaum erforscht, da es bisher nicht gelang größere Mengen dieses Blaulichtrezeptors aufzureinigen.^[111] Das Reparaturenzym zeigt jedoch bei einem Salzgehalt von 500 mM eine relativ uneingeschränkte Reparaturaktivität. Ebenfalls beobachtet werden konnte eine Abhängigkeit dieser Reparaturaktivität von der Art des Salzes, wobei Salze, die als Protonendonoren wirken können, sogar die Aktivität des Enzyms erhöhen.^[111]

1.3.9. Cryptochrome

Cryptochrome sind Blaulichtrezeptoren, die zu den Photolyasen eine hohe Sequenzähnlichkeit aufweisen. Sie sind in der Natur weit verbreitet und kommen in Bakterien, Pflanzen und Tieren vor und steuern in diesen Organismen verschiedene Signalkaskaden.^[112] Diese Photorezeptoren steuern eine Vielzahl an Prozessen, wie z.B. die Photomorphogenese in Pflanzen und sind an der lichtabhängigen Synchronisation der zirkadianen Uhr und Magnetorezeption in Tieren und Pflanzen, sowie an der Reparatur einzelsträngiger DNA beteiligt.^[112-117] Cryptochrome besitzen eine hohe Sequenzidentität zu den DNA-Photolyasen und lassen sich in drei Klassen unterteilen: die pflanzlichen, die tierischen und die DASH Cryptochrome (benannt nach den Organismen, in denen die ersten DNA-bindenden Cryptochrome entdeckt wurden: *D. melanogaster*, *A. thaliana*, *Synechocystis*, *Human*). Die

Sequenzidentität zwischen tierischen Cryptochromen und (6-4)-Photolyasen beträgt bis zu 50 %, während die Sequenzen der DASH Cryptochrome und CPD-Klasse I Photolyasen noch bis zu 30 % identisch sind.^[112, 118-121]

Die meisten Cryptochrome besitzen eine N-terminale den Photolyasen verwandte Region und eine C-terminale Domäne variierender Länge. Diese C-termini beinhalten das DAS-Motiv bestehend aus einem Aspartatabschnitt (D), gefolgt von einer sauren Region (A) und einem serinhaltigem Motiv (S).^[122] Die C-terminale Domäne ist wichtig für die Lokalisierung und Stabilität der Cryptochrome und ist an der Phototransduktion beteiligt.^[112, 122] Prokaryotischen und DASH Cryptochromen jedoch fehlt diese C-terminale Verlängerung.^[123, 124] In der N-terminalen Photolyase-ähnlichen Region binden Cryptochrome den katalytischen FAD-Kofaktor in der U-Form, sowie einen Pterin-Antennenkofaktor.^[112] Die aktive FAD-Form des Signalzustandes ist in pflanzlichen und tierischen Cryptochromen der neutrale semichinoide FADH[•]-Zustand.^[125, 126] Jedoch konnte in letzter Zeit gezeigt werden, dass in einigen Insekten-Cryptochromen FAD[•] der aktive signalübertragende Zustand ist und in DASH-Cryptochromen FADH[•] als die katalytisch aktive Form agiert.^[124, 127-129] Die Generierung der jeweils in Cryptochromen vorliegenden reduzierten FAD-Form läuft über Elektronentransferwegen ähnlich den Photolyasen unter Beteiligung einer Tryptophan-Triade und unter Ausbildung eines Tyrosyl-Radikals ab.^[130]

Die Klasse der DASH-Cryptochrome bindet an einzelsträngige DNA und ist in der Lage in dieser enthaltene CPD-Schäden zu reparieren. Ihr Bindungsvermögen ergibt sich aus den in der Umgebung des katalytischen FAD-Kofaktors vorliegenden basischen Aminosäuren. Zur Bindung und Reparatur doppelsträngiger DNA ist diese Klasse der DNA-Reparaturenzyme aufgrund einer im Vergleich zu Photolyasen weniger hydrophoben DNA-Bindungstasche nicht in der Lage. Bedingt durch diese geringere Hydrophobizität in der Bindungstasche können DASH Cryptochrome die für das Herausdrehen des CPD-Schadens aus der Duplex-DNA benötigte Energie nicht aufbringen. Dies wurde am *A. thaliana* DASH Cryptochrom 3 unter Verwendung von loopstrukturierten Oligonukleotiden gezeigt.^[117] Die Bindung der einzelsträngigen DNA erfolgt in DASH Cryptochromen auf ähnlich Weise wie zuvor in CPD-Photolyasen beobachtet. So stabilisieren auch im *A. thaliana* Cryptochrom 3 die $\alpha 6$ - und $\alpha 16$ - Helices den Protein-DNA-Komplex. Dennoch scheint die elektrostatische Stabilisierung aufgrund ihrer deutlich größeren polaren Seitenketten verringert, die anstatt der in CPD-Enzymen vorliegenden Glycinreste 150 und Prolinreste 151 mit der DNA interagieren. Salzbrücken zum P⁺ Phosphat werden vom DASH-Cryptochrom von einem Argininrest 392 ausgebildet, der ebenfalls in beiden Photolyasefamilien präsent ist. Ein

weiterer Argininrest 446 bildet zur Stabilisierung der Basen eine Salzbrücke zum P^0 Phosphat aus. Diese Aufgabe übernimmt in (6-4)-Photolyasen der mit dem P^{+1} Phosphat interagierenden Argininrest, während in CPD-Photolyasen keine Wechselwirkungen mit dem P^0 Phosphat beobachtet werden konnten. Die Salzbrücken zum P^{+2} Phosphat werden wie in der *A. nidulans* CPD-Photolyase durch einen Lysin- und Glutaminrest formiert. Auch bestehen zwischen den C4-Carbonylgruppen des 3'- und 5'-Thymins und den N6-Adeninaminogruppen des FADs Wasserstoffbrücken. Ein markanter Unterschied besteht jedoch darin, dass einer der Tryptophanreste (W392) des L-förmigen hydrophoben Keils der Photolyasen im DASH Cryptochrom 3 durch ein Tyrosin 434 ersetzt ist. Dieser Tyrosinrest dreht sich nach Bindung des CPD-Schadens um 70° in die Bindungstasche hinein und kann so über sein aromatisches System mit dem Cyclobutananteil wechselwirken. Zusätzlich kann der Tyrosinrest noch über eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem P^{-1} Phosphat interagieren. Im Vergleich zu den CPD-Photolyasen konnten ebenso Wasserstoffbrücken zwischen dem 5'-Thymin und einem Glutamin 325 bzw. zwischen dem 3'-Thymin und einem Asparaginrest 391 beobachtet werden. Im Falle des in CPD-Photolyasen mit dem 3'-Thymin interagierenden Methioninrest ist in DASH Cryptochromen diese Position durch den Glutaminrest 395 besetzt (Abb. 1.17).^[117] Somit weisen wie die CPD-Photolyasen auch die DASH Cryptochrome deutliche Unterschiede im aktiven Zentrum und in der Art der Wechselwirkungen mit dem DNA-Schaden im Vergleich zu (6-4)-Photolyasen auf.

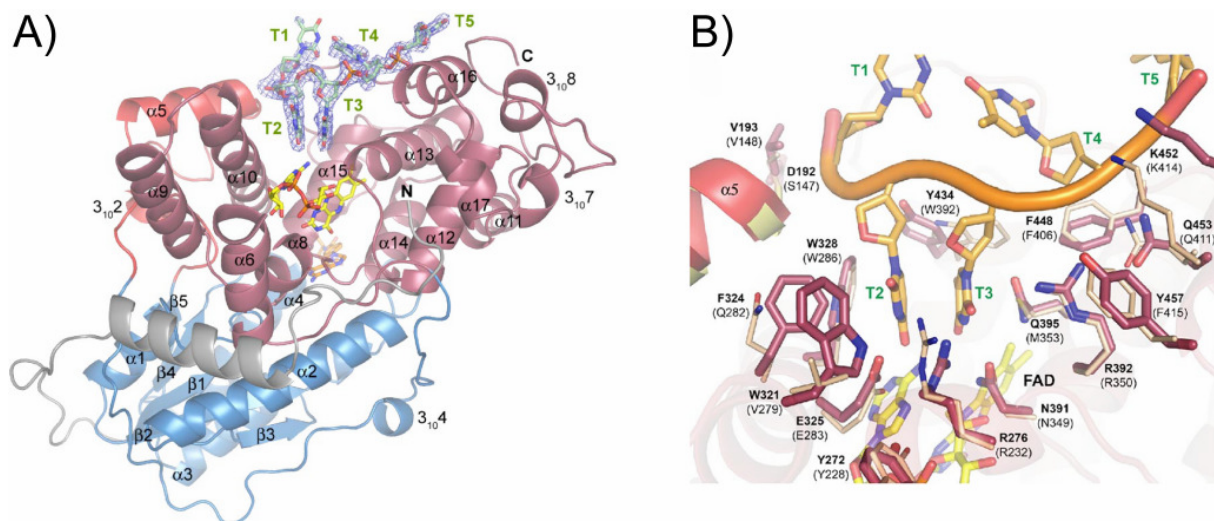


Abbildung 1.17: *A. thaliana* DASH Cryptochrom 3 mit repariertem CPD-Schaden. A) Ribbon Modell des gesamten Komplexes und B) Ansicht der CPD-Bindungstasche (PDB ID: 2VTB).^[117]

1.4. Zielsetzung und Motivation

In dieser Arbeit war es ein Ziel die photochemischen Unterschiede der *E. coli* YcgF BLUF-Domäne im Vergleich zu anderen gut charakterisierten BLUF-Domänen enthaltenden Proteinen zu untersuchen und diese subtypischen Eigenschaften in Richtung des Subtyps I (z.B. SyPixD) zu konvertieren. Um die photochemischen Eigenschaften der *E. coli* YcgF BLUF-Domäne in Richtung dieses Subtyps zu verändern, müssen ausgehend vom *E. coli* YcgF-(1-137), das zusätzlich zur BLUF-Domäne aus einem putativen α -helikalem Segment besteht, Oberflächenmutanten hergestellt werden. Die Aufreinigung der Mutanten sollte analog zum nativen YcgF-(1-137) über die Rückfaltung von *Inclusion Bodies* durchgeführt werden, so dass im Verlauf dieser Rückfaltung der Flavinchromophor homolog in die BLUF-Domäne inkorporiert werden kann. Durch anschließende biophysikalische Methoden sollten die photochemischen und sensorischen Eigenschaften, sowie die Stabilität der YcgF-(1-137) Oberflächenmutanten mit dem nativen Photorezeptor, sowie den alleinstehenden BLUF-Protein verglichen werden. Anhand dieser Daten können dann Rückschlüsse auf den Photozyklus des bakteriellen Blaulichtrezeptors gezogen werden.

In einem zweiten Projekt war es Aufgabe die *A. thaliana* (6-4)-Photolyase in den CPD-Klasse I Subtyp zu konvertieren. Hierfür sollte zunächst die native (6-4)-Photolyase rekombinant produziert und aufgereinigt werden. Anschließend werden Oberflächenmutanten benötigt, in denen die für die Bindung des (6-4)-Schadens benötigten Aminosäuren gegen in CPD-Photolyasen an der DNA-Bindung beteiligte ausgetauscht werden. Diese sollten kloniert, aufgereinigt und ihre Stabilität untersucht werden. In dem nächsten Schritt sollte UV/VIS spektroskopisch überprüft werden, ob der FAD-Kofaktor im nativen Enzym und seinen Mutanten in die katalytisch aktive FADH⁻-Form überführt werden kann. Zum Abschluss sollten das Bindungsverhalten der Oberflächenmutanten an CPD-haltige und ungeschädigte DNA mittels Gelshift-Experimenten untersucht und Reparaturassays mit dem CPD-Schaden durchgeführt werden. Diese Daten können Hinweise über den Einfluss der ausgetauschten Aminosäuren auf die spezifische Erkennung des DNA-Schadens und die Reparaturaktivität der *A. thaliana* (6-4)-Photolyase liefern. Anhand dieser Resultate sollten die Unterschiede der beiden Photolyasefamilien in Bezug auf die Erkennung und Reparatur der jeweiligen Photoschäden diskutiert werden.

Die Zielsetzung des dritten Aufgabenbereichs war als weitere (6-4)-Photolyase das *D. salina* Enzym rekombinant zu produzieren, welches eine extrem lange C-terminale α -helikale Extension aufweist. Für diese Photolyase sollte zunächst ein Aufreinigungsprotokoll etabliert werden. Daran anschließend sollten unterschiedliche FAD Redoxzustände generiert und diese

in Bezug auf ihre Stabilität, strukturellen Änderungen und ihr unspezifisches DNA-Bindungsverhalten analysiert werden. Die erhaltenen Daten sollten mit zuvor untersuchten Photolyasen verglichen und die im Verlauf der photochemischen Reduktion beobachteten strukturellen Änderungen in Bezug auf eine zweite den Cryptochromen ähnliche Funktionalität diskutiert werden.

2. Material

2.1. Geräte

Gerät	Hersteller und Typenbezeichnung
AEKTA [®] Purifier-System	Box 900, Fraktionskollektor Frac-950, Monitor pH/C-900, Monitor UV-900, Pumpe P-900 (<i>GE Healthcare</i> , Freiburg)
Autoklav	T-Line [™] (<i>Fedegari</i> , Albuzzano, Italien) (<i>Webeco</i> , Bad Schwartau)
Brutschrank	(<i>Binder</i> , Tuttlingen) (<i>Heraeus</i> , Hanau)
bidest. Wasser-Anlage	Seral Seralpur Pro90CN (<i>Seral</i> , Celle)
CD-Spektropolarimeter	J-810 (<i>Jasco</i> , Groß-Umstadt)
Digitalkamera	Powershot A70 (<i>Canon</i> , Krefeld)
Elektrophoresespannungsquellen	EPS 300 (<i>GE Healthcare</i> , Freiburg) E443 (<i>Kreutz Consort</i> , Reiskirchen)
Elektroporator	Micro Pulser (<i>Biorad GmbH</i> , München)
Emulsifier	EmulsiFlex C5 (<i>Avestin</i> , Ottawa, Kanada)
FPLC-System 250	Fraktionskollektor Frac-100, Gradienten-Programmierer, GP-250 Plus, Pumpen P-500, UV-Einheit 2238 UVCord S II (<i>GE Healthcare</i> , Freiburg)
Gelapparaturen	Agarosegele: (<i>Feinmechanik</i> , Philipps-Universität, FB Chemie, Marburg); SDS-Gele: Mighty Small II SE (<i>Hoefer Scientific</i> , San Francisco, USA) Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis System, PROTEAN II xi System (<i>Bio-rad</i> , München)
Geldokumentationssysteme	Computer E.A.S.Y., Kamera (<i>UVP</i> , England), UV-Schirm (<i>Herolab</i> , Wiesloch), Thermodrucker UP-D 895 (<i>Sony</i> , Berlin) Odyssey [®] (<i>LI-COR Biosciences</i> , Bad Homburg)
Gelschüttler	3013 (<i>GFL</i> , Burgwedel)
Heizblock	BT3 (<i>American Instrument Exchange</i> , Haverhill, USA)
Kristallisationsroboter	Cartesian Microsys [™] SQ4000 (<i>Genomic Solutions</i> , Huntingdon, GB) LISSY (<i>Zinsser Analytic</i> , Frankfurt)
Lampen	View Aqua 601, Liberty 100 (<i>Conrad</i> , Hirschau)

LEDs	625 nm (<i>ROITHNER LaserTechnik</i> , Wien Österreich)
Mikroskope	B601 (<i>Olympus</i> , Hamburg); MZ8 (<i>Leica</i> , Wetzlar)
NMR-Spektrometer	DRX 600 MHz (<i>Bruker</i> , Karlsruhe)
PCR-Maschinen	Mastercycler gradient (<i>Eppendorf</i> , Wesseling-Berzdorf) Gene Amp PCR System 2400 (<i>PERKINS ELMER</i> , Waltham, USA) Robocycler Gradient 96 (<i>Stratagene</i> , La Jolla, USA)
pH-Meter	(<i>Satorius</i> , Göttingen)
Pipetten	Research variabel (<i>Eppendorf</i> , Wesseling-Berzdorf)
QIAcube	(<i>Qiagen</i> , Hilden)
Quarzküvetten	110-QS 1 mm und 2 mm, 105.200-QS 10 mm, 105.250-QS 10 mm (<i>Hellma GmbH & Co KG</i> , Müllheim)
Schüttler	CERTOMAT® IS (<i>Satorius</i> , Göttingen) EB SM25 und EB Swip (<i>Edmund Bühler</i> , Hechingen) Multitron 2 (<i>Infors AG</i> , Basel, Schweiz) New Brunswick (New York, USA)
Thermomixer	Comfort (<i>Eppendorf</i> , Wesseling-Berzdorf)
Ultraschallgerät	Sonoplus HD200 mit Spitze Typ UW 200 (<i>Bandelin electronic</i> , Berlin)
UV/VIS Spektrometer	HP 8453 (<i>Hewlett Packard</i> , Böblingen) NanoDrop 1000 (<i>peqlab</i> , Erlangen) Ultrospec 3100 pro (<i>GE Healthcare</i> , Freiburg) UV-2401PC (<i>Shimadzu Corp.</i> , Kyoto, Japan)
UV Sichttisch	6 x 15 W; TF-20M (<i>Vilber Lourmat</i> , Eberhardzell)
Vortexer	REAX 2000 (<i>Heidolph</i> , Schwabach)
Waagen	DeltaRange® PC2200 (<i>Mettler-Toledo</i> , Gießen) LabStyle 54 (<i>Mettler-Toledo</i> , Gießen)
Wasserbad	NK22 (<i>Haake</i> , Karlsruhe)
Zentrifugen	Biofuge fresco (<i>Heraeus</i> , Hanau) Sigma Laborzentrifuge 2 K 15 (<i>B. Braun</i> , Melsungen) Falkontube-Zentrifuge: Centrifuge 5810 R (<i>Eppendorf</i> , Wesseling-Berzdorf) Kühlzentrifuge: Biofuge 13R (<i>Heraeus</i> , Hanau) Kühlzentrifuge: J2-21M/E Centrifuge mit JA-10 und JA-20 Rotor (<i>Beckmann Coulter</i> , Krefeld) Tischzentrifuge: Biofuge 15 (<i>Heraeus</i> , Hanau) Picozentrifuge: Harmony (<i>LMS Labortechnik</i> , Rosenheim)

Tabelle 2.1: Verwendete Geräte.

2.2. Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien

Alle nicht nachfolgend in Tabelle 3.2 aufgelisteten Chemikalien wurden von *Merck* (Darmstadt), *Roth* (Karlsruhe) und *Sigma Aldrich* (München) in p.a. Qualität bezogen. Für Kristallisationsansätze wurden nur Chemikalien von *Fluka* (München) in den Qualitäten BioChemika Ultra oder p.a. verwendet. Restriktionsenzyme und Polymerasen stammen von *New England Biolabs* (Frankfurt) und *Stratagene* (La Jolla, USA) und für die molekularbiologische DNA-Präparation und Aufreinigung wurden ausschließlich Kits von *Qiagen* (Hilden) benutzt. DNA- und SDS-PAGE-Molekulargewichtsmarker stammen von *Fermentas* (St. Leon-Rot).

Material	Hersteller und Typenbezeichnung
Agarose	(<i>Invitrogen</i> , Karlsruhe)
Bacto-Trypton und Yeast Extrakt	(<i>Difco</i> , Lawrence, USA)
BC Assay Quantitation Kit	(<i>Uptima</i> , Montluçon cedex, Frankreich)
Bradford-Reagenz	(<i>Bio-rad GmbH</i> , München)
BSA	(<i>Applichem GmbH</i> , Darmstadt)
Coomassie-Brilliant Blue R-250	(<i>Serva Electrophoresis GmbH</i> , Heidelberg)
Dialysemembran	(<i>Thermo Scientific</i> , Rockford, USA)
DNase I	(<i>Boehringer Mannheim GmbH</i> , Mannheim)
DTT	(<i>Biomol GmbH</i> , Hamburg)
Einmalküvetten	(<i>Sarstedt</i> , Nümbrecht)
Elektroporationsküvetten	(<i>VWR</i> , Darmstadt)
Kalibrierkit für Größenausschlusschromatographie	(<i>GE Healthcare</i> , Freiburg)
IPTG	(<i>Duchefa</i> , Haarlem, Niederlande)
Kaliumacetat	(<i>Riedel-de-Haën</i> , Hannover)
Kanamycin	(<i>Applichem GmbH</i> , Darmstadt)
Konzentratoren	(<i>Millipore</i> , Bad Schwalbach)
Kristallisationszubehör	VIEWseal™-Klebefolien, 96 well Innovaplate (<i>InnovadyneTechnologies, Inc.</i> Santa Rosa, USA) Deckgläser (21 mm Durchmesser), VDX-Platten, Cryoschleifen und Zubehör (<i>Hampton Research</i> , Aliso Viejo, USA)
LDAO	(<i>Fluka</i> , München)

Lysozym	(Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim)
MOPS	(Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg)
Natriumchlorid	(Applichem GmbH, Darmstadt)
Rubidiumchlorid	(GE Healthcare, Freiburg)
Säulenmaterialien	Superdex 200 pg (GE Healthcare, Freiburg) Ni-NTA fast flow (Qiagen, Hilden)
Sterilfilter	(Millipore, Bad Schwalbach)
TCEP · HCl	(Applichem GmbH, Darmstadt)
T4 DNA Ligase	(GE Healthcare, Freiburg)
Tris ultra pure	(ICN Biomedicals, Costa Mesa, USA)
Xylencyanol FF	(Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg)

Tabelle 2.2: Verwendete Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien.

2.3. Vektoren

Die nachfolgend aufgezeigten Vektoren pET28a und pET36b (Novagen) wurden für die rekombinante Proteinproduktion verwendet. Beide Vektorsysteme ermöglichen die Aufreinigung über Ni-NTA-Affinitätschromatographie durch rekombinante Fusion eines N-bzw. C-terminalen His₆-tags an das Protein. Die Transkription der zu exprimierenden Gene ist von der T7-RNA-Polymerase abhängig und IPTG induziert (Abb. 2.1, 2.2).

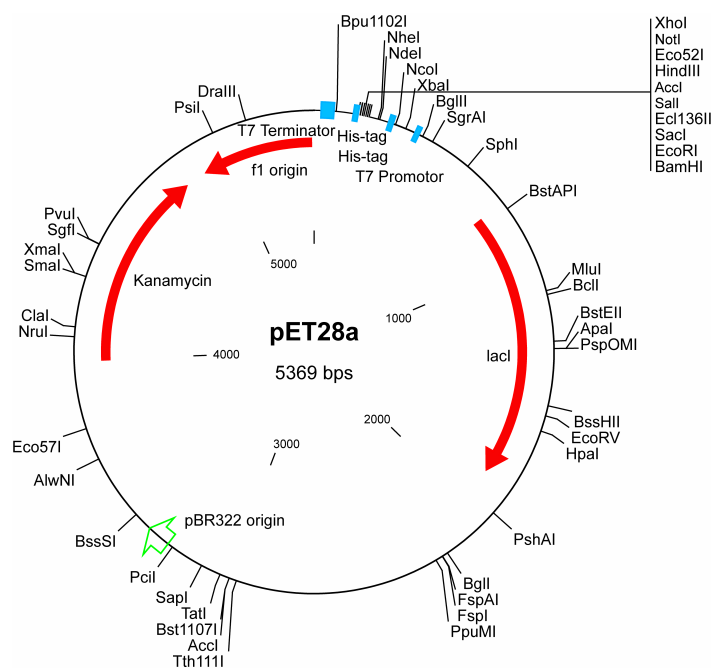


Abbildung 2.1: Vektorkarte von pET28a.

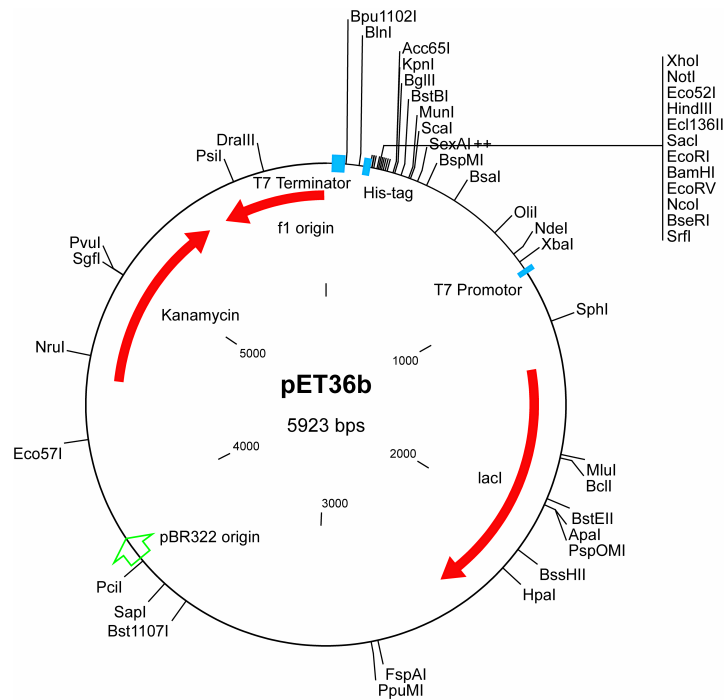


Abbildung 2.2: Vektorkarte von pET36b.

2.4. Mikroorganismen

2.4.1. *E. coli* DH5 α

Genotyp: F Φ 80 Δ lacZ Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17*($r_k^- m_k^+$) *phoA supE44 \lambda^- thi-1 gyrA96 relA1*

Aufgrund ihrer hohen Transformationseffizienz wurden elektrokompente *E. coli* DH5 α (*Invitrogen Ltd.*) Zellen zur Transformation von Ligationsansätzen, nach Mutagenesereaktionen und zur Vervielfältigung von Plasmiden eingesetzt.

2.4.2. TOP10F'

Genotyp: F' $\{lacI^q$ Tn10 (Tet^R) $\}$ *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80 Δ lacZ Δ M15 Δ lacX74 *recA1 araD139* Δ (*ara-leu*)7697 *galU galK rpsL endA1 nupG*

Bei dem *E. coli* TOP10F' (*Invitrogen Ltd.*) Stamm handelt es sich ebenfalls um einen Klonierungsstamm. Dieser wurde zur Transformation nach TOPO-Klonierungen verwendet.

2.4.3. *E. coli* BL21-Gold (DE3)

Genotyp: B strain F⁻ *ompT* *hsdS*(rB⁻ mB⁻) *dcm*⁺ Tetr galλ(DE3) *endA* Hte

Die *E. coli* BL21-Gold (DE3) (*Stratagene*) Zellen sind für die Genexpression von Plasmiden mit T7-Promotor geeignet. Sie besitzen auf dem im Chromosom insertiertem Prophagen DE3 ein Strukturgen für die T7-RNA-Polymerase, das unter Kontrolle des lacUV5-Promotors leicht durch IPTG zu induzieren ist. Dies ist essentiell, um Gene unter T7-Promotorkontrolle durch Induktion mit IPTG zu exprimieren. Der Stamm enthält keine OmpT- und Lon-Proteasen, und das *endI*-Gen, das die Endonuklease I kodiert, ist ebenfalls inaktiviert. Der Hte-Phänotyp steigert ihre Transformationseffizienz.

2.4.4. *E. coli* Rosetta (DE3)

Genotyp : RosettaTM F⁻ *ompT* *hsdSB*(rB⁻ mB⁻) *gal dcm* pRARE2 (CamR)

Bei den *E. coli* Rosetta (DE3) (*Novagen*) Zellen handelt es sich um ein BL21-Derivat, das die Produktion von eukaryotischen Proteinen erleichtert. Dazu enthält der Stamm tRNAs, die für die von *E. coli* selten verwendeten Codons, wie AGG, AGA (Arg), AUA (Ile), CUA (Leu), CCC (Pro), and GGA (Gly) codieren.

2.5. Oligonukleotide

2.5.1. Primer

Alle nachfolgenden Primer wurden bei *Invitrogen* (Karlsruhe) oder *Metabion* (Martinsried) als lyophilisiertes Pulver in desalted Qualität bestellt.

2.5.1.1. *A. thaliana* (6-4)-DNA-Photolyase

Klonierungsprimer

Primer	Sequenz (5' → 3')	Restriktionsschnittstelle
fwd_AraPL	CGTGGCAGC <u>ATTAA</u> TGCTACTGGATCCGGTTCAGT	<i>AseI</i> / <i>MseI</i>
rev_AraPL	CGCAGCAGAGCTCCTATTTGAGTTTTGGTCGTTGGT TCC	<i>SacI</i>

Tabelle 2.3: Klonierungsprimer für *A. thaliana* (6-4)-DNA-Photolyase; die Schnittstellen sind unterstrichen und das Stoppcodon ist kursiv dargestellt.

Mutageneseprimer

Primer	Sequenz (5' → 3')	Restriktions-schnittstelle
Q162T	GCCACCTTTGAGTTATACATCATTTCTGAAGGTTGCTG GG	
Q162G	GGAAGCCACCTTTGAGTTATGGATCCTTTCTGAAGGTT GCTGG	<i>Bam</i> HI
K246R	GTGGCAAACCTTTGAGAAACCA <u>CGA</u> GGTGATCCATCTGC CTTC	<i>Dra</i> III
Q298E	CAGTTTCTCTCCTCGGGGAGTTGTTGTGGCGAG	<i>Ava</i> I
H364N_L365R	GGGTTGGATGCACAAATCGCGCGTCACTGTGTAG	<i>Bss</i> HII
H364N_L365R_ H368M	GGGGTTGGATGCACAAATCGCGCGTATGTGTGTAGCC TGTTTTCTTACTC	<i>Bss</i> HII
H364N_L365R_ H368Q	GGTTGGATGCACAAATCGCGCGTCACTGTGTAGCCTG	<i>Bss</i> HII
H368M	GGTTGGATGCACCATCTAGCGCGTATGTGTGTAGCCTG	
H368Q	CCATCTAGCGCGTCACTGTGTAGCCTGTTTTT	
W408Y	GGGCAATCAACAATGGAAATTGGATGTACTTATCATGT TCGTCTG	
F427Q	CCGCATCTACTCTCCTATATCTCAGGGAAAGAAGTATG ATCCTG	

Tabelle 2.4: Mutageneseprimer für *A. thaliana* (6-4)-DNA-Photolyase: Die Primerbezeichnung enthält die jeweils veränderte Aminosäure. Ausgetauschte Basen sind rot und eventuell enthaltende Schnittstellen unterstrichen dargestellt.

2.5.1.2. *E. coli* BLUF- Domäne YcgF-(1-137)

Primer	Sequenz (5' → 3')	Restriktions-schnittstelle
Y7F	GCTTACCACCCTTATTTTCGTCAGCCATATACGTGAC	
M23I	CCTGTCAAAAAAATCGAAGAAATCGTTTCGATCGCAAATCGCAGG	<i>PvuI</i>
M23L	GTCAAAAAAATCGAAGAACTGGTTTCGATCGCAAATCGCAGG	<i>PvuI</i>
A90W	CTGCTCGCCGTTTTGGCAAATGGGAATGGAATTATTTG	

Tabelle 2.5: Mutageneseprimer für die *E. coli* BLUF Domäne YcgF-(1-137): Die Primerbezeichnung enthält die jeweils veränderte Aminosäure. Ausgetauschte Basen sind rot und eventuell enthaltene Schnittstellen unterstrichen dargestellt.

2.5.2. Oligonukleotide für Gelshift-Assay

Die für den Gelshift-Assay verwendeten Oligonukleotide wurden bei *Metabion* (Martinsried) als lyophilisiertes Pulver in massenspektrometrisch überprüfter HPLC Qualität bestellt.

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Markierung
OligoM (Middle)	GAGGTGTAATTAATGTGGAG	Phospat
OligoLA* (Left Arm)	AAAATGCTGGATGTC	IRD700
OligoRA (Right Arm)	CTGTAGGTCGTAAAA	Phospat
OligoLAMRA-50 (Left Arm_Middle_Right Arm)	AAAATGCTGGATGTCGAGGTGTAATTAATGTG GAGCTGTAGGTCGTAAAA	
OligoCT-40 (Complement Total)	CGACCTACAGCTCCACATTAATTACACCTCGA CATCCAGC	
OligoCT-40*	CGACCTACAGCTCCACATTAATTACACCTCGA CATCCAGC	IRD700
OligoCT-50 (Complement Total)	TTTTACGACCTACAGCTCCACATTAATTACAC CTCGACATCCAGCATTTT	
OligoCT-40_CS4	CGACCTACAGCTCCACATACCATACACCTCGA CATCCAGC	

Tabelle 2.6: Für Gelshift-Assay verwendete Oligonukleotide: Die Markierungen (*) befinden sich am 5'-Ende. In den Primern enthaltene *VspI*-Schnittstellen sind unterstrichen dargestellt. Alle Oligonukleotide wurden mit dem Programmen Mfold (*Rensselaer*) und DNAMelt (*COMB Bioinformatics*) auf Loopregionen und Hairpinstrukturen überprüft.

2.6. Kulturmedien

Alle folgenden Mengenangaben beziehen sich soweit nicht anders angegeben auf Ansätze im 1 L Maßstab. Die entsprechenden Zutaten wurden zusammengegeben, in entionisiertem Wasser gelöst und 30 min bei 121 °C und 1.5 bar autoklaviert.

LB-Medium (Lysogeny Broth)^[131]

10 g Bacto-Trypton
 5 g Bacto-Yeast Extrakt
 10 g NaCl
 0.4 mL 10 M NaOH

Zur Herstellung von LB-Agar wurden vor dem Autoklavieren 15 g/L Agar zum gelösten Medium gegeben.

TB-Medium (Terrific Broth)^[131]

<i>Medium</i>	<i>Puffer</i>
12 g Bacto-Trypton	0.17 M KH ₂ PO ₄
24 g Bacto-Yeast Extrakt	0.72 M K ₂ HPO ₄
4 mL Glycerin	ad 100 mL dest. H ₂ O
ad 900 mL dest. H ₂ O	

Nach dem Autoklavieren wurden zu 900 mL Medium 100 mL Phosphatpuffer hinzugefügt.

SOC Medium^[131]

20 g Bacto-Trypton	20 mL 1 M Glucose
5 g Bacto-Yeast Extrakt	
0.5 g NaCl	
10 mL KCl-Lösung (250 mM)	
pH auf 7.0 einstellen	

Nach dem Autoklavieren wurde die sterilfiltrierte Glucose zum Medium hinzugegeben.

2.7. Antibiotika

Antibiotikum	Endkonzentration
Kanamycin	35 µg/mL
Chloramphenicol	30 µg/mL

3. Methoden

3.1. Molekularbiologische Methoden

Die mit Mikroorganismen durchgeführten Arbeiten wurden gemäß Gentechnikgesetz (GenTG) vom 20.06.1990 durchgeführt und fielen unter die Sicherheitsstufe S1. Alle beim Arbeiten mit Bakterien kontaminierten Laborgefäße und Lösungen wurden autoklaviert (60 min, 121 °C, 1.5 bar) oder über Nacht mit Virkon (*Tetenal*) inaktiviert.

3.1.1. Plasmidpräparation

Die Plasmid-DNA wurde nach einem modifizierten Protokoll von Birnboim und Doly durchgeführt.^[132] Hierbei wird chromosomale DNA alkalisch denaturiert, während die superhelikale Plasmid-DNA in Lösung vorliegt. Durch anschließende Neutralisation mit Kaliumacetat werden die chromosomale DNA, Proteine und Zelltrümmer ausgefällt und können abgetrennt werden.

3.1.1.1. *Plasmidpräparation mittels Anionentauschersäulchen*

Bei dieser Methode erhält man sehr reine Plasmid-DNA, die anschließend für Sequenzierungen, Klonierungen und für die Stammsammlung verwendet wurde. Die Plasmid-DNA wird hierbei unter Hochsalzbedingungen an eine Silicamatrix gebunden und anschließend unter Niedrigsalzbedingungen eluiert.

4 mL einer *E. coli* DH5 α oder TOP10F' Übernachtskultur wurden pelletiert (13000 rpm, 2 min, RT), der Überstand verworfen und das Pellet in 250 μ L P1-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 250 μ L P2-Puffer und Mischen durch vorsichtiges Invertieren wurde die Lösung bis zur vollständigen alkalischen Lyse 5 min inkubiert. Dann wurden zur Neutralisation 350 μ L Puffer N3 hinzupipettiert, die Suspension abermals invertiert und 5 min inkubiert. Durch anschließendes Zentrifugieren (13000 rpm, 10 min, RT) wurden die ausgefällte chromosomale DNA, Proteine und Zelltrümmer abgetrennt. Der erhaltene Überstand wurde auf eine QIAprep spin Säule (*Qiagen*) aufgetragen, diese zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Die sich auf der Säule befindende Plasmid-DNA wurde mit 750 μ L PE-Puffer gewaschen (13000 rpm, 1 min, RT), der Durchfluss verworfen und trocken zentrifugiert (13000 rpm, 2 min, RT). Die DNA wurde mit 30 μ L EB-Puffer nach 1 minütiger Inkubation und anschließendem Zentrifugieren (13000 rpm, 1 min, RT) von der Säule eluiert.

Die Plasmidpräparation wurde ebenfalls automatisiert mit dem QIAcube (*Qiagen*) durchgeführt.

3.1.1.2. Plasmidpräparation mittels Alkoholpräzipitation

Diese Methode wurde alternativ zur Präparation von Plasmid-DNA mittels Anionenaustauschersäulchen durchgeführt. Die erhaltene DNA weist einen geringeren Reinheitsgrad als bei der zuvor beschriebenen Vorschrift (Abschnitt 3.1.1.1) auf, der jedoch ausreichend für die Analyse der Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen ist.

Das durchgeführte Protokoll ist bis zur alkalischen Lyse mit Puffer P2 identisch mit der zuvor (Abschnitt 3.1.1.1) beschriebenen Methode. Anschließend wurde die Lösung mit 350 µL Puffer P3 neutralisiert, invertiert, 10 min auf Eis inkubiert und zentrifugiert (13000 rpm, 15 min, 4 °C). Der Überstand wurde in ein neues 1.5 mL Reaktionsgefäß überführt, mit 600 µL Isopropanol versetzt und kurz vortexiert. Nach 30 minütiger Inkubation auf Eis wurde die ausgefällte Plasmid-DNA pelletiert (13000 rpm, 45 min, 4 °C) und der Überstand verworfen. Dieses Plasmid-DNA-Pellet wurde mit 300 µL 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, zentrifugiert (13000 rpm, 10 min, 4 °C) und 10 min bei 37 °C getrocknet. Anschließend wurde das gereinigte Plasmid-DNA-Pellet in 50 µL EB-Puffer aufgenommen.

Puffer P1	Puffer P2	Puffer P3	EB-Puffer
50 mM Tris/HCl, pH 8.0 10 mM EDTA 100 µg/mL RNase A	200 mM NaOH 1 % (w/v) SDS	2.55 M KOAc	10 mM Tris/HCl, pH 8.5

3.1.2. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*: PCR) wurde von Mullis *et al.* entwickelt und publiziert.^[133] Bei dieser Methode wird die Templat-DNA *in vitro* mit Hilfe von Oligonukleotiden und Desoxyribonukleinsäuren von einer thermostabilen Polymerase in einem zyklischen Prozess zu vervielfältigt. Der Zyklus einer PCR besteht aus einem Denaturierungs-, Hybridisierungs- und Elongationsschritt. Bei ersterem wird der DNA-Doppelstrang aufgespalten; während des folgenden Hybridisierungsschrittes lagern sich die Primer an die einzelsträngige DNA an und im Elongationsschritt wird der DNA-Strang ausgehend vom Primer durch die Polymerase in 5'→3' Richtung verlängert. Nach jedem Zyklus (n) wächst die Menge an amplifizierter DNA exponentiell auf 2ⁿ an.

Ein typischer 50 µL PCR-Ansatz bestand aus:

Templat-DNA (1:100 / 1:1000 verdünnt)	1 µL
dNTPs (2 mM)	1 µL
fwd Primer (10 nM)	1 µL
rev Primer (10 nM)	1 µL
5 x HF Puffer	10 µL
Phusion Polymerase (2 U/µL)	0.5 µL
Dest. H ₂ O	ad. 50 µL

Die PCR wurde mit dem Robocycler Gradient 96 (*Stratagene*) nach folgendem Programm durchgeführt:

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	98 °C	5 min	1
Hybridisierung	55 – 66 °C	5 min	1
Elongation	72 °C	1 min 30 s	1
Denaturierung	98 °C	45 s	35
Hybridisierung	55 – 66 °C	40 s	
Elongation	72 °C	1 min 5 s	
Finale Elongation	72 °C	7 min	1

Tabelle 3.1: PCR Programm für Phusion Polymerase bei Verwendung des Robocycler Gradient 96.

Die Denaturierungstemperatur kann im Bereich von 92 - 98 °C liegen und ist von der jeweils verwendeten Polymerase abhängig. Der Phusion Polymerase (*Finnzymes*, *NEB*) entsprechend wurden 98 °C gewählt. Die Hybridisierungstemperatur sollte 3 °C höher als die Schmelztemperaturen der verwendeten Primer liegen und ist von ihrem GC-Gehalt und ihrer Länge abhängig.^[134] Die Schmelztemperaturen der verwendeten Primer wurde anhand der folgenden Formel berechnet.

$$T = 59.9 + 41 \cdot GC\text{-Gehalt} - (675/Primerlänge) \quad (3.1)$$

Für den Elongationsschritt der Primer durch die Polymerase mit den zugesetzten dNTPs wurden entsprechend der Phusion Polymerase 1000 bp je 15 s veranschlagt.

Des Weiteren wurden zu jedem Zeitintervall für den Robocycler spezifisch 15 – 20 s dazu gerechnet.

Abschließend erfolgte ein finaler 7 minütiger Elongationsschritt bei 72 °C, um zu gewährleisten, dass alle amplifizierte DNA-Stränge die gewünschte Länge besitzen.

3.1.3. Ortsspezifische Mutagenese

Bei der ortsspezifischen oder gerichteten Mutagenese (*site-directed mutagenesis*) wird eine gezielte Veränderung der DNA ermöglicht. Dabei können spezifisch einzelne oder mehrere Nukleinbasen eines Gens ausgetauscht, hinzugefügt oder entfernt werden.

Für die ortsspezifische Mutagenese wurden die Phusion Polymerase (*Finnzymes, NEB*) und die Pfu-Turbo Polymerase (*Stratagene*) verwendet. Zum Austausch einiger Basen wurden zwei zueinander revers komplementäre Primer eingesetzt, die die gewünschte Mutation tragen. Die Primer sollten eine Schmelztemperatur im Bereich von 78 °C bis 82 °C besitzen, welche mit folgender Formel berechnet wurde.^[135]

$$T_m = 81.5 + 0.41(\% \text{ GC-Gehalt}) - 675/\text{Primerlänge} - \% \text{ mismatch} \quad (3.2)$$

Ein typischer 50 µL PCR-Ansatz bestand aus:

Phusion Polymerase		Pfu-Turbo Polymerase	
Templat-Plasmid-DNA (50 ng)	1 µL	Templat-Plasmid-DNA (50 ng)	1 µL
dNTPs (2 mM)	1 µL	dNTPs (2 mM)	1 µL
DMSO	1.25 µL	fwd Primer (100 ng/µL)	1.25 µL
fwd Primer (100 ng/µL)	1.25 µL	rev Primer (100 ng/µL)	1.25 µL
rev Primer (100 ng/µL)	1.25 µL	10 x Puffer	5 µL
5 x HF-Puffer	10 µL	Polymerase (2.5 U/µL)	1 µL
Polymerase (2 U/µL)	1 µL	Dest. H ₂ O	39.5 µL
Dest. H ₂ O	33.25 µL		

Die PCR wurde mit dem Gene Amp PCR System 2400 (*PERKINS ELMER*) unter Verwendung der folgenden Programme durchgeführt.

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	98 / 95 °C	1 min / 30 s	1
Denaturierung	98 / 95 °C	30 s	16
Hybridisierung	55 °C	1 min	
Elongation	72 °C	2 min 15 s / 7 min 30 s	
Finale Elongation	72 °C	8 min / 7 min	1

Tabelle 3.2: Mit Gene Amp PCR System 2400 durchgeführte Mutageneseprogramme für Phusion Polymerase / Pfu-Turbo Polymerase.

Zum Entfernen der Templat-DNA wurde anschließend ein *DpnI*-Verdau durchgeführt. Die Restriktionssendonuklease *DpnI* erkennt spezifisch die Methylgruppen der Templat-DNA und spaltet diese an der Erkennungssequenz 5'-Gm⁶ATC-3'.

Ein typischer Ansatz wurde wie folgt pipettiert:

	Phusion Polymerase	Pfu-Turbo Polymerase
PCR Ansatz	50 µL	50 µL
Puffer 4	5.5 µL	-
<i>DpnI</i> (20 U/µL)	1 µL	1 µL
Inkubation	2 h, 37 °C	1 h, 37 °C

3.1.4. PCR Aufreinigung

Diese Aufreinigungsmethode wurde nach einer PCR, einer Plasmidpräparation mittels Alkoholpräzipitation oder zwischen einem sequentiellen Verdau durchgeführt. Mit dieser Methode können der jeweilige Puffer ausgetauscht und verdaute RNA, Nukleotide, Primer usw. abgetrennt werden.

Die zu reinigende Lösung wurde mit 5 Volumen an PBI-Puffer (*Qiagen*) versetzt, auf eine QIAquick spin Säule (*Qiagen*) aufgetragen, 5 min inkubiert und zentrifugiert (13000 rpm, 1 min RT). Anschließend wurde der Durchfluss verworfen und die sich auf der Säule

befindende DNA mit 750 μ L PE-Puffer gewaschen und zentrifugiert (13000 rpm, 1 min RT). Der Durchfluss wurde ebenfalls verworfen und die Säule trocken zentrifugiert (13000 rpm, 2 min RT). Die DNA wurde nach Zugabe von 30 μ L EB-Puffer, 1 minütiger Inkubation und anschließender Zentrifugation (13000 rpm, 1 min RT) von der Säule eluiert.

3.1.5. Agarosegelelektrophorese

Bei der Agarosegelelektrophorese werden negativ geladene DNA-Fragmente durch Anlegen eines elektrischen Feldes in einer Gelmatrix proportional ihrer Größe nach aufgetrennt. Durch Variation der Agarosekonzentration kann die Porengröße der Gelmatrix und somit der Trennbereich und das Auflösungsvermögen des Gels angepasst werden. Die aufgetrennten DNA-Fragmente können anschließend mit Ethidiumbromid, das über π - π -Stapelwechselwirkungen an die DNA-Basen anlagert bzw. zwischen diesen interkaliert, unter UV-Bestrahlung ($\lambda = 256$ nm) visualisiert werden.

Die Agarosegelelektrophorese wurde zur Analyse nach analytischen Restriktionsverdauen, zur Aufreinigung nach präparativen Restriktionsverdauen und PCR-Reaktionen, sowie zur Abschätzung von DNA-Konzentrationen durchgeführt.

Es wurden 1 % Agarosegele in TBE Puffer verwendet. Zur Gelherstellung wurde die Agarose im Puffer erhitzt, bis eine klare Lösung entstand. Nachdem die Agaroselösung auf ca. 50 °C abgekühlt war, wurde diese in die horizontale Gelelektrophoreseapparatur mit Probenkamm gegossen und nach Auspolymerisieren mit TBE-Puffer überschichtet. Der Probenkamm wurde entfernt und die zuvor im Verhältnis 5:1 mit 6 x DNA-Probenpuffer versetzten DNA-Proben aufgetragen. Als Größenstandard wurde der MassRuler™ DNA Ladder Mix (*Fermentas*) verwendet. Für analytische Gele wurde eine Stromstärke von 110 mA und für präparative Gele eine Stromstärke von 90 mA angelegt. Nach einer Stunde wurden die Agarosegele mit Ethidiumbromid angefärbt und unter UV-Licht photographiert.

10 x TBE-Puffer	6 x DNA-Probenpuffer	Ethidiumbromidlösung
1 M Tris	0.25 % (w/v) Xylencylanol	200 mL dest. H ₂ O
1 M Borsäure	1.5 % Ficoll Typ 400	200 μ g Ethidiumbromid
20 mM EDTA		

3.1.6. DNA-Extraktion aus präparativen Agarosegelen

Die Aufreinigung der DNA-Fragmente aus präparativen Agarosegelen erfolgte nach PCR-Reaktionen oder wurde vor Ligationen durchgeführt.

Die zu extrahierende DNA-Bande wurde auf dem UV-Leuchttisch ausgeschnitten, mit 3 Volumen QG-Puffer versetzt und 10 min bei 50 °C inkubiert. Während dieses Schrittes wurde die Probe alle 2 bis 3 min vortexiert. Die klare gelbe Lösung wurde mit einem Volumen an Isopropanol versetzt, auf eine QIAquick spin Säule (*Qiagen*) aufgetragen und zentrifugiert (13000 rpm, 1 min, RT). Der Durchfluss wurde verworfen, 750 µL PE-Puffer auf die Säule pipettiert und zentrifugiert (13000 rpm, 1 min, RT). Anschließend wurde der Durchfluss ebenfalls verworfen und die Säule trocken zentrifugiert (13000 rpm, 2 min RT). Die DNA wurde nach Zugabe von 30 µL EB-Puffer und 1 minütiger Inkubation durch Zentrifugieren (13000 rpm, 1 min RT) von der Säule eluiert.

3.1.7. Hydrolytische Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Bei dieser Methode wurden Typ II Restriktionsendonukleasen verwendet. Diese hydrolysieren die Phosphordiesterbindung beider DNA-Stränge an meist palindromischen Sequenzen. Hierbei können DNA-Fragmente mit 5'- bzw. 3'- komplementären Einzelstrangüberhängen (*sticky ends*) oder vollständig basengepaarte glatte Enden (*blunt ends*) entstehen.

Analytische und präparative hydrolytische Spaltungen der DNA mit Restriktionsenzymen wurden im Bezug auf Pufferbedingungen und Inkubationstemperaturen den Angaben des Herstellers entsprechend durchgeführt.

	analytischer Ansatz	präparativer Ansatz
Plasmid / PCR-Produkt	1-2 µL / -	10-15 µL / 30 µL
10 x Puffer	1.5 µL	5 µL
100 x BSA (10 mg/mL)	0.15 µL	0.5 µL
Enzym (10-20 U/µL)	0.2 µL	1-1.5 µL
Bidest. H ₂ O	ad 15 µL	ad 50 µL
Inkubation	2 h	3-4 h
Inaktivierung		10 min, 65 °C

Die durch präparative Verdaue erhaltenen Vektorfragmente wurden anschließend zur Abspaltung der 5' Phosphatgruppen 1 h bei 37 °C mit 1 µL (10 U/µL) CIP (Calf Intestinal Phosphatase) inkubiert.

3.1.8. Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration einer DNA-Lösung wurde photometrisch am NanoDrop 1000 (*peqlab*) bei 260 nm bestimmt. Zur Berechnung wurde folgende Formel verwendet:^[136]

$$c_{DNA} [ng \cdot \mu L^{-1}] = A_{280} \cdot 50 ng \cdot \mu L^{-1} \quad (3.3)$$

3.1.9. Ligation

Die T4-Phagen-DNA-Ligase katalysiert unter ATP-Verbrauch die Ausbildung einer Phosphodiesterbindung zwischen der 3'Hydroxylgruppe und der 5'-Phosphatgruppe.

Ein typischer Ligationsansatz wurde wie folgt zusammenpipettiert:

Vektor-DNA	20 fmol
Insert-DNA	100 fmol
10 x Puffer	1.5 µL
T4 Ligase (400 U/µL)	1 µL
Dest. H ₂ O	ad 15 µL
Inkubation	2 h, RT

3.1.10. Entsalzung von Ligationsansätzen und Mutageneseansätzen

Vor der elektrochemischen Transformation müssen die im Ligationsansatz und *DpnI*-Verdau enthaltenen Salze durch Dialyse entfernt werden.

Für die Entsalzung wurden Dialysefilter (*Millipore*) mit einer Porengröße von 0.025 µm verwendet. Es wurde 2 h gegen das 2000-fache Volumen bidest. H₂O dialysiert.

3.1.11. DNA-Sequenzanalyse

Sequenzierungen der rekombinant hergestellten Plasmide wurden von der Firma *Qiagen* nach einer modifizierten Kettenabbruchmethode nach Sanger durchgeführt.^[137] Die erhaltenen Sequenzen wurden mit dem Programm Megalign (*DNASTAR*) auf ihre Korrektheit überprüft.

3.1.12. Transformation kompetenter Zellen

3.1.12.1. Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Die chemisch kompetenten Zellen wurden nach der RbCl-Methode produziert.^[131, 138]

Mit einer Einzelkolonie eines frisch auf LB-Agar ausgestrichenen Glycerinstocks wurde eine 50 mL LB-Vorkultur angeimpft und über Nacht angezogen (225 rpm, 37 °C). Von dieser Kultur wurde 1:100 auf eine 100 mL Kultur übergeimpft und diese bis zu einer OD₅₉₅ von ca. 0.5 inkubiert (225 rpm, 37 °C). Nach kurzem Abkühlen dieser Kultur wurden die Zellen pelletiert (4000 rpm, 10 min, 4 °C), der Überstand verworfen und das Pellet in 30 mL TFBII-Puffer aufgenommen. Nach 2 stündiger Inkubation auf Eis wurde die Zellsuspension abermals zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Anschließend wurden die Zellen in 4 mL TFBII-Puffer resuspendiert und in 50 µL Volumen aliquotiert. Die Aliquots wurden sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zu ihrer Verwendung bei -80 °C gelagert.

Nach Herstellung wurden die kompetenten Zellen auf ihre Transformationseffizienz und Reinheit getestet. Dafür wurden einerseits eine definierte Menge eines bekannten Plasmids und andererseits die gleiche Menge bidest. H₂O transformiert. Die Zellen wurden anschließend auf LB-Agarplatten mit unterschiedlichen Selektionsmarkern ausplattiert.

TFBI-Puffer	TFBII-Puffer
100 mM RbCl	10 mM MOPS
50 mM MnCl ₂	10 mM RbCl
30 mM Kaliumacetat	75 mM CaCl ₂
10 mM CaCl ₂	15 % (v/v) Glycerin
15 % (v/v) Glycerin	

3.1.12.2. Transformation chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Die Membran der kompetenten Zellen wurde durch die zuvor beschriebene Behandlung mit bestimmten Salzen so verändert, dass während des Hitzeschocks die Plasmid-DNA leichter von der Zelle aufgenommen werden kann.

Zu 50 µL chemisch kompetenten *E. coli* Zellen wurden etwa 200 bis 300 ng Plasmid-DNA pipettiert und die Zellsuspension 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (42 °C, 90 s) wurde die Probe kurz auf Eis gekühlt und 950 µL LB-Medium hinzugefügt. Im Anschluss wurden die Zellen 1 h regeneriert (225 rpm, 37 °C), auf selektiven LB-Agarplatten ausgestrichen und diese über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.1.12.3. Herstellung elektrokompetenter *E. coli* Zellen

Elektrokompetente Zellen wurden nach einem leicht modifizierten Protokoll von Dower hergestellt.^[139]

Mit einer Einzelkolonie eines frisch auf LB-Agar ausplattierten Glycerinstocks wurde eine 50 mL LB-Vorkultur angeimpft und über Nacht geschüttelt (225 rpm, 37 °C). Von dieser Kultur wurde 1:100 auf eine 1 L Kultur übergeimpft und diese bis zu einer OD₅₉₅ von ca. 0.8 angezogen (225 rpm, 37 °C). Anschließend wurde die Kultur 20 min auf Eis inkubiert und die Zellen pelletiert (4000 rpm, 10 min, 4 °C). Der Überstand wurde abdekantiert und das Zellpellet in 450 mL eisgekühltem sterilem bidest. Wasser resuspendiert. Die Zellen wurden erneut pelletiert (4000 rpm, 10 min, 4 °C) und der Waschschrift wiederholt. Das so erhaltene Zellpellet wurde in 450 mL eisgekühltem 10 % (v/v) Glycerin aufgenommen, zentrifugiert (4000 rpm, 10 min, 4 °C) und das Pellet in 2.5 mL eisgekühltem 10 % (v/v) Glycerin resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in 50 µL Aliquots aufgeteilt und direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Zellen wurden bis zu ihrer Verwendung bei -80 °C gelagert.

Nach Herstellung wurden die kompetenten Zellen auf ihre Transformationseffizienz und Reinheit getestet (Abschnitt 3.1.12.1).

3.1.12.4. Transformation elektrokompetenter *E. coli* Zellen

Die Zellen werden bei diesem Prozess kurz einem starken elektrischen Feld (ca. 2.5 kV) ausgesetzt. Dadurch erhöht sich die Permeabilität der Bakterienmembran, und die Aufnahme der Plasmid-DNA ist erleichtert.

Zu 50 µL elektrokompetenten *E. coli* Zellen wurden ca. 100 ng Plasmid-DNA pipettiert und die Zellsuspension in eine vorgekühlte 200 µL Elektroporationsküvette (2 mm Spaltbreite) überführt. Die Zellen wurden einem elektrischem Puls von 5 bis 6 ms ausgesetzt (Programm Ec2) und nach sofortigem Resuspendieren in 950 µL LB-Medium 1 h geschüttelt (225 rpm, 37 °C). Anschließend wurden die Zellen auf selektiven LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.1.13. Stammhaltung

Zur Lagerung wurden von den Bakterienkulturen Glycerin- oder DMSO-Stocks angelegt. Dazu wurden von einer 4 mL Übernachtskultur Bakterien im Verhältnis 1:2 mit Glycerin oder mit 10 % DMSO gemischt, kurz vortexiert und sofort in flüssigen Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

3.1.14. Herstellung T<>T haltiger DNA

Das für die Gelshift-Experimente verwendete, den CPD-Schaden enthaltende, Oligonukleotid wurde im AK Prof. Batschauer (Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg) bestrahlt und aufgereinigt.^[117]

3.1.14.1. Bestrahlung des Oligonukleotids

In einer Quarzküvette mit Stopfen wurden 40 µM OligoM in 10 % (v/v) Aceton, 120 µM Silbernitrat und TE-Puffer 30 min auf Eis mit Argon gespült. Anschließend wurde das Oligonukleotid 3 min mit UV-Licht (312 nm) bestrahlt und wieder 3 min auf Eis gestellt. Dieser Vorgang wurde viermal wiederholt. Nach Abschluss der Bestrahlung wurden alle Schritte unter grünem Sicherheitslicht durchgeführt. Das CPD geschädigte OligoM wurde in Gegenwart von 75 mM Natriumacetat und 70 % (v/v) Ethanol 2 h bei -20 °C gefällt und pelletiert (13000 rpm, 10 min, 4 °C). Der Überstand wurde abdekantiert, das Pellet mit 500 µL 100 % Ethanol gewaschen und zentrifugiert (13000 rpm, 10 min, 4 °C) und der Überstand erneut verworfen. Der letzte Waschriss wurde wiederholt und das erhaltene DNA-Pellet in der Speedvac 10 min bei RT getrocknet. Das OligoM wurde in 20 µL TE-Puffer aufgenommen, 10 min bei 50 °C resuspendiert und kurz zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues 1.5 mL Reaktionsgefäß überführt.

3.1.14.2. Aufreinigung der Oligonukleotide

In den nächsten Schritten wurden das OligoLA*, das CPD-haltige OligoM, und das OligoRA mit dem komplementärem OligoCT hybridisiert. Im Anschluss wurden die auf diese Weise angeordneten ersten drei Oligonukleotide ligiert und das erhaltene vollständige Oligonukleotid erneut mit dem Gegenstrang hybridisiert. Anschließend wurde die doppelsträngige DNA mit *VspI* geschnitten, um das ungeschädigte Oligonukleotid, welches eine intakte *VspI* Schnittstelle enthält, mit einem denaturierenden Gel abzutrennen. In einem weiteren Ansatz mit ungeschädigtem OligoM wurde bis zur zweiten Hybridisierung analog verfahren. Dieser Ansatz wurde jedoch nicht verdaut, um so die Vergleichsprobe mit ungeschädigtem Oligonukleotid zu erhalten.

1. Hybridisierung

OligoM (80 µM)	2.5 µL
OligoLA* (100 µM)	2 µL
OligoRA (100 µM)	2 µL
OligoCT (100 µM)	2 µL
10 x Puffer O (<i>Fermentas</i>)	2 µL
Nukleasefreies Wasser	ad 18 µL
Inkubation	95 °C, 5 min → 1 °C/ min auf RT abkühlen

Ligation

Hybridisierungsansatz	18 µL
ATP (10 mM)	1 µL
T4 Ligase (5 U/ µL)	1 µL
Inkubation	22 °C, 3 h
Inaktivierung	65 °C, 10 min

2. Hybridisierung

Ligationsansatz	20 µL
10 x Puffer O (<i>Fermentas</i>)	1 µL
Nukleasefreies Wasser	ad 29 µL
Inkubation	95 °C, 5 min → 1 °C/ min auf 37 °C abkühlen

VspI-Verdau

Hybridisierungsansatz	29 µL
<i>VspI</i> (10 U/ µL) / nukleasefreies Wasser	1 µL
Inkubation	37 °C, 18 h
Inaktivierung	65 °C, 20 min

Zur Abtrennung des CPD-haltigen Oligonukleotids wurde ein denaturierendes 6 % Polyacrylamidgel mit Harnstoff verwendet. Die Elektrophorese wurde mit dem Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis System (*Bio-rad*) durchgeführt. Die Gele wurden wie folgt gegossen:

Grundrezept für 6 % Polyacrylamidgel mit Harnstoff

Harnstoff	2.1 g in 3.5 mL MilliQ Wasser
Rotiporesegel 40	0.8 mL
10 x TBE	0.5 mL
MilliQ Wasser	0.2 mL
TEMED	5 µL
APS 10 % (w/v)	50 µL

Zu 30 µL Oligonukleotidprobe wurden 20 µL einer Lösung mit 95 % (v/v) Formaldehyd / 20 mM EDTA pipettiert und diese 3-5 min bei 75 °C inkubiert. Als Referenz wurde eine DNA-Probe bestehend aus je 1 µL OligoLA* und OligoCT*, 7 µL TE-Puffer und 6 µL 95 % Formaldehyd / 20 mM EDTA Lösung verwendet.

Die Auftrennung der Oligonukleotide erfolgte 2 h bei 70 V in TBE-Puffer. Die gewünschten Banden wurden nach Scannen des Gels mit dem Odyssey (*LI-COR Biosciences*), ausgeschnitten, zerkleinert und in 1 mL TE-Puffer resuspendiert. Über Nacht wurde die DNA bei 50 °C und 1400 rpm extrahiert. Danach wurde die Probe filtriert, mit Ethanol gefällt, getrocknet und in 20 µL TE-Puffer aufgenommen.

10 x TBE-Puffer	TE-Puffer
1 M Tris	10 mM Tris/HCl
1 M Borsäure	1 mM EDTA
25 mM EDTA	

3.1.14.3. Konzentrationsbestimmung mittels Odyssey

Zur Konzentrationsbestimmung wurden die aufgereinigten Oligonukleotide in unterschiedlichen Verdünnungen auf ein Harnstoffgel aufgetragen und mit Referenzproben des OligoLA* (1, 2, 5, 10, 20, 50 fmol) verglichen. Nach 1.20 h wurde die Gelelektrophorese beendet, das Harnstoffgel mit dem Odyssey Infrared Imaging System (*LI-COR Biosciences*) eingescannt und die Oligonukleotidkonzentrationen mit der Software Odyssey 3.0 (*LI-COR Biosciences*) ausgewertet.

3.2. Proteinchemische Methoden

3.2.1. Heterologe Genexpression in *E. coli*

Als Vollmedien wurden LB- bzw. TB-Medium verwendet, die mit den entsprechenden Selektionsmarkern versetzt wurden.

Von einer 50 mL LB-Vorkultur wurde 1:50 auf 2 L LB-Medium übergeimpft und diese bis zu einer OD₅₉₅ ca. 0.5 inkubiert (225 rpm, 37 °C). Nach Induktion mit 1 mM IPTG wurde die Kultur 2 h geschüttelt. Für Expressionen unter Bedingungen der Autoinduktion wurden 2 L TB-Medium 1:100 mit einer 50 mL LB-Vorkultur angeimpft und 24 h angezogen (225 rpm, 30 °C bzw. 25 °C).^[140, 141] Die Zellen wurden pelletiert (6000 rpm, 10 min, JA10, 4 °C), in 20 mL Puffer A bzw. Puffer B resuspendiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Von der Vorkultur, vor Induktion der Expressionskultur und vor der Zellernte wurden je 1 mL Proben zum Überprüfen des Expressionsverlaufs mittels SDS-PAGE entnommen.

Puffer A	Puffer B
20 mM Tris/HCl, pH 8.0	50 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 7.4
200 mM NaCl	500 mM / 2 M NaCl
	5 % (v/v) Glycerin

3.2.2. Zellaufschluss

Der Zellaufschluss wurde bei löslichen Proteinen mit dem Emulsiflex C5 (*Avestin*) und zum Aufschluss von *Inclusion Bodies* unter Zugabe von Lysozym durchgeführt.

3.2.2.1. Zellaufschluss mittels Emulsiflex

Bei dieser Methode wird die Zellsuspension einem hohen Druck ausgesetzt. Durch anschließenden schnellen Druckabfall sind die Zellen starken Scherkräften ausgesetzt, zerreißen und setzen ihre Bestandteile frei.

Der Zellaufschluss wurde unter Eiskühlung durchgeführt. Hierbei wurden 20 mL *E. coli* Zellen in Puffer B mit 0.075 mM EDTA und 0.075 mM PMSF versetzt und in zwei Durchgängen mit dem Emulsifier (*Avestin*) aufgeschlossen. Zu Zellproben, die sehr viel DNA enthielten, wurden vor dem Aufschluss 400 U DNase I pipettiert. Im Anschluss wurden die unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugieren abgetrennt (16000 rpm, 40 min, JA 20, 4 °C) und der lösliche Überstand für die folgende Proteinreinigung eingesetzt.

3.2.2.2. Zellaufschluss mit Lysozym

Bei dieser Aufschlussmethode verdaute das Lysozym das Mureingerüst der Bakterienzellwände und kann so die Zellbestandteile freisetzen. Durch Zusatz von LDAO und DNase I werden Zellmembranen solubilisiert und zelleigene DNA verdaut, die im weiteren Aufreinigungsprozess stören würden.

Die in 20 mL Puffer A resuspendierten Zellen wurden nach Zugabe von 1 mM EDTA, 0.6 mM PMSF und 24 mg Lysozym inkubiert (20 min, gelegentlichem Schütteln, RT). Im nächsten Schritt wurden 0.75 % (w/v) LDAO hinzupipettiert und die Suspension geschüttelt (225 rpm, 30 min bei 37 °C). Anschließend wurden 500 U DNase I zur Zellsuspension

gegeben und diese unter gelegentlichem Schütteln inkubiert (30 min, RT). Dieser Schritt wurde bis zum Erhalt einer homogenen Zellsuspension wiederholt. Die aufgeschlossene Zellsuspension wurde zentrifugiert (15000 rpm, 30 min, JA 20, 4 °C), der Überstand verworfen und die Pellets für die Aufreinigung verwendet.

3.2.3. Reinigung von *Inclusion Bodies*

Die *Inclusion Bodies* wurden dreimal mit Puffer A, 1 mM EDTA, 0.3 mM PMSF und 0.75 % LDAO, gewaschen, einmal in Puffer A, 1 mM EDTA und 0.3 mM PMSF und letztendlich zweimal mit bidest. Wasser. Dabei wurden die *Inclusion Bodies* mittels Potter-Homogenisator in der jeweiligen Waschlösung resuspendiert und anschließend zentrifugiert (15000 rpm, 10 min, JA 20, 4 °C). Nach dem 6. Waschschrift wurde die Suspension zu je 2 mL aliquotiert, die *Inclusion Bodies* pelletiert (13000 rpm, 30 min, 4 °C) und diese zur weitere Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.2.4. Rückfaltung der *Inclusion Bodies*

Bei der Rückfaltung wird zunächst fehlgefaltetes Protein mit chaotropen Salzen, die hydrophobe Wechselwirkungen im Protein stören, und Disulfidbrücken spaltenden Reduktionsmitteln vollständig denaturiert. Durch langsames Absenken der denaturierenden Bedingungen kann sich das Protein zurückfalten. Die Zugabe des Kofaktors erleichtert die Rückfaltung durch Stabilisierung des nativen Zustands.

Die *Inclusion Bodies* wurden in Puffer A, versetzt mit 6 M GdnHCl und 0.1 M DTT, gelöst und ein 15-facher Überschuss an FMN hinzugegeben. Dann wurde die *Inclusion Body*-haltige Lösung 1.5 Tage gegen Puffer A bzw. Puffer C in einem SnakeSkin Dialyseschlauch 3.5 MWCO (*Pierce*) dialysiert. Der proteinhaltige Überstand wurde nach Zentrifugation (4000 rpm, 10 min, 4 °C) weiter aufgereinigt.

Puffer C

20 mM Tris/HCl, pH 8.0

3.2.5. Ni²⁺-NTA Affinitätschromatographie

Bei dieser Art der Affinitätschromatographie wird die reversible Interaktion von Histidinen aus rekombinant angefügten His-tags mit den freien Koordinationsstellen des durch Nitrilotriessigsäure komplexiertem Ni²⁺ ausgenutzt. Da die Wechselwirkungen durch Konkurrenz von Imidazol oder Verringerung des Puffer-pH-Wertes abnehmen, können Proteine durch Einstellen dieser Bedingungen eluiert werden.

Für die Proteinreinigung wurden 7 mL Ni²⁺-NTA Superflow Material (*Qiagen*) in einem XK16 Säulenkörper (*GE Healthcare*) verwendet. Die Ni²⁺-NTA Affinitätschromatographie wurde mit einer Flussrate von 0.3 mL / min an einem AEKTA[®] Purifier-System (*GE Healthcare*) durchgeführt. Der filtrierte Rohzelleextrakt wurde in Puffer B auf die Säule aufgetragen und anschließend über 7 Säulenvolumina gewaschen. Nach einem Waschschritt mit Puffer D über 5 Säulenvolumina wurde zur Elution ein Gradient über 12.5 Säulenvolumina von Puffer B zu Puffer E angelegt. Die Fraktionen, die das gewünschte Protein enthielten, wurden vereinigt und weiter aufgereinigt.

Puffer D	Puffer E
50 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 7.4	50 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 7.4
500 mM / 2 M NaCl	500 mM / 2 M NaCl
5 % (v/v) Glycerin	5 % (v/v) Glycerin
3 mM Imidazol	250 mM Imidazol

3.2.6. Ultrafiltration

Mittels Ultrafiltration können Proteine ankonzentriert werden. Da die Poren der für diese Methode verwendeten Konzentratoren eine definierte Größe besitzen, kann das gewünschte Protein zurückgehalten werden, während kleinere Proteine und Pufferkomponenten die Membran passieren.

Für die Ultrafiltration wurden 4 und 15 mL Konzentratoren (*Millipore*) mit Porengrößen von 10, 30 bzw. 50 MWCO verwendet. Die Proteinlösungen wurden durch Zentrifugieren (1500 g, 3 min, 4 °C) ankonzentriert. Nach jedem Zentrifugationsschritt wurde die Proteinlösung durchmischt, um die Aggregation des Proteins durch zu hohe lokale Konzentration an der Membran zu verhindern. Durch Glycerinzugabe konnten auch extrem instabile Proteine ankonzentriert werden.

3.2.7. Größenausschlusschromatographie

Bei der Größenausschlusschromatographie erfolgt die Trennung der Proteine entsprechend ihrer Größe. Dabei werden kleine Protein später eluiert, da sie häufiger die Poren der quervernetzten Agarose Gelmatrix passieren als größere Proteine.

Als Säule wurden die Superdex 200 XK 16/70 (~130 mL Säulenvolumen) bzw. eine Superdex 200 10/300 (23 mL Säulenvolumen) verwendet. Beide Säulen wurden zuvor mit Kalibrierkits für die Größenausschlusschromatographie (*GE Healthcare*) kalibriert. Die Größenausschlusschromatographie wurde mit dem ÄKTA® Purifier System (*GE Healthcare*) oder dem FPLC-System (*GE Healthcare*) in Puffer A, B bzw. Puffer F durchgeführt. Es wurden maximal 1 % des Säulenvolumens an Proteinlösung aufgetragen und mit einer Flussrate von 0.5 bzw. 0.3 mL/min gearbeitet. Der Elution wurde bei 280 nm und am ÄKTA® Purifier System bei zwei weiteren Wellenlängen der Absorptionsmaxima der jeweiligen Kofaktoren detektiert.

Puffer F

20 mM Tris/HCl, pH 7.4

100 mM NaCl

3.2.8. Umpufferung

Für einige der nachfolgend beschriebenen analytischen Methoden und für die Kristallisation war eine Umpufferung bzw. Entsalzung der aufgereinigten Proteine notwendig, um geeignete Pufferbedingungen zu erhalten. Diese Art der Umpufferung über Säulen basiert auf dem Prinzip der Größenausschlusschromatographie. Dabei wurden Proteine, da sie wesentlich größer als das Ausschlussvolumen des Säulenmaterials Sephadex G-25 M sind, zuerst eluiert und niedermolekulare Substanzen (z.B. Pufferkomponenten, Kofaktoren) konnten durch ihre spätere Elution im Säulenvolumen abgetrennt werden. Zum Einsatz kamen gebrauchsfertig gepackte PD-10 und G-50 Säulen (*GE Healthcare*).

3.3. Analytische Methoden

3.3.1. Bestimmung der Proteinkonzentration

3.3.1.1. *Bradford-Assay*

Für die Konzentrationsbestimmung nach Bradford wurde die Coomassie-Brilliant Blue G-250 Lösung (*Bio-rad*) verwendet.^[142] Der Farbstoff reagiert mit den basischen Aminosäuren des Proteins. Nach Ausbildung eines Protein-Farbstoff-Komplexes verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 nm nach 595 nm.

Durch Erstellen einer Kalibriergeraden mit BSA-Lösungen im Bereich von 0 bis 20 mg/mL ließ sich der Proteingehalt bestimmen. Die Bradfordlösung wurde im Verhältnis 1:5 mit dest. Wasser gemischt. Zu 990 µL oder 999 µL dieses Reagenz wurden je nach Proteingehalt 1 µL oder 10 µL Proteinlösung pipettiert. Die Mischung wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, die Absorption bei 595 nm gemessen und die Konzentration bestimmt.

3.3.1.2. *BC Assay*

Die Konzentrationsbestimmung mit dem BCA-Test wurde mit dem BC Assay Quantitation Kit (*Uptima*) durchgeführt.^[143] Bei diesem Nachweis reduzieren die Peptidbindungen der Proteine Cu^{2+} zu Cu^+ . Das Cu^+ bildet mit der Bicinchoninsäure einen Chelat-Komplex, der bei 562 nm sein Absorptionsmaximum besitzt.

Anhand einer Standardreihe mit BSA-Konzentrationen im Bereich von 0 bis 2 mg/mL ließ sich die Proteinkonzentration ermitteln. Von der Proteinlösung wurden eine 1:2 und 1:5 Verdünnung mit einem Endvolumen von 50 µL angesetzt. Nach Zugabe von 1 mL eines 50:1 Gemisches aus Cu^{2+} -Lösung und Bicinchoninsäure zur Proteinlösung wurden die Ansätze inkubiert (30 min, 37 °C). Anschließend wurden die Absorptionen bei 562 nm gemessen und die Konzentration ermittelt.

3.3.1.3. *Photometrische Bestimmung bei 280 nm*

Für die Konzentrationsbestimmung bei 280 nm wurden 200 µL Proteinlösung zuvor in Gegenwart von 7.2 % TCA für 1 h auf Eis denaturiert und pelletiert (13000 rpm, 10 min, 4 °C). Die Pellets wurden zweimal in 220 µL Puffer F mit 7.2 % (w/v) TCA und zweimal mit 500 µL dest. Wasser gewaschen und zentrifugiert (13000 rpm, 10 min, 4 °C). Im Anschluss wurde das Pellet in 6 M GdnHCl, 20 mM KHPO_4 , pH 6.4 gelöst und die Proteinkonzentration anhand eines spezifischen kalkulierten Extinktionskoeffizienten bei 280 nm bestimmt.^[144, 145]

$$\epsilon (\text{Protein}) = N (\text{Tyr}) \cdot \epsilon (1280) + N (\text{Trp}) \cdot \epsilon (5690) + N (\text{Cystin}) \cdot \epsilon (120) \quad (3.4)$$

3.3.2. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli dient der qualitativen Proteinanalyse und Reinheitskontrolle des zu reinigenden Proteins.^[146] Bei dieser Methode werden die Proteine durch Maskierung ihrer Eigenladung mit SDS und Anlegen eines elektrischen Feldes in einer Gelmatrix proportional ihrer Größe nach aufgetrennt. Durch Variieren der Acrylamidkonzentration kann die Porengröße der Gelmatrix und somit der Trennbereich und das Auflösungsvermögen des SDS-Gels angepasst werden.

Die SDS-PAGE wurde mit Mighty Small II SE250 (*Hoefel Scientific*) Gelapparaturen durchgeführt. Für die Elektrophorese wurden 12 % bzw. 15 % Trenngele verwendet. Zu den untersuchenden Proteinproben wurde SDS-Probenpuffer pipettiert und diese 5 min bei 95 °C denaturiert. Als Größenstandard wurde ein SDS-PAGE Molekulargewichtsmarker (*Fermentas*) verwendet. Die Auftrennung im SDS-PAGE Gel erfolgte bei Stromstärken im Bereich von 20 bis 25 mA.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel ca. 30 min in Färbelösung unter Schütteln gefärbt und anschließend 1 bis 2 h in Entfärbelösung inkubiert, bis die Proteinbanden sichtbar wurden.^[147]

	12 % Trenngel	15 % Trenngel	4 % Sammelgel
30 % Rotiphoresegel (37.5:1)	4 mL	5 mL	1.33 mL
dest. H ₂ O	2.57 mL	1.57 mL	6.57 mL
3 x Trenngelpuffer	3.33 mL	3.33 mL	-
5 x Sammelgelpuffer	-	-	2 mL
10 % SDS	100 µL	100 µL	100 µL
TEMED	10 µL	10 µL	10 µL
10 % (w/v) APS	50 µL	50 µL	100 µL

3 x Trenngelpuffer	5 x Sammelgelpuffer
1.125 M Tris/HCl, pH 8.8	0.625 M Tris/HCl, pH 6.8
30 % (w/v) Saccharose	

10 x SDS-PAGE Laufpuffer	2 x SDS-Probenpuffer
0.25 M Tris	62.5 mM Tris/HCl, pH 6.8
2 M Glycin	15 % (v/v) Glycerin
1 % (w/v) SDS	4 % (w/v) SDS
	1 Spatelspitze Bromphenolblau
	4 % (v/v) β -Mercaptoethanol

Färberlösung	Entfärberlösung
0.25 % (w/v) Coomassie Blue R-250	5 % (v/v) Essigsäure
5 % (v/v) Essigsäure	28 % (v/v) Isopropanol
50 % (v/v) Ethanol	
1 min rühren, filtrieren	Regenerierung mit Aktivkohle, filtrieren

3.3.3. Immunoblotanalyse (Western Blot)

Bei dieser Methode wurden aufgetrennte Proteine aus einem Trenngel auf einen geeigneten Träger, z.B. Nitrocellulose oder Nylon übertragen. Nach dem ‚Blotting‘ können spezifische Proteine durch Immunodetektion nachgewiesen werden. Dabei gehen an den Antikörper gekoppelte AP- oder HRP-Konjugate mit BCIP und NBT oder Luminol eine Farb- bzw. Chemilumineszenzreaktion ein.^[148]

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden durch die semi-dry electroblotting Methode auf eine Nitrocellulosemembran (*Schleicher und Schuell*) übertragen. Dabei wurden die in Blotpuffer inkubierte Membran und das SDS-PAGE Gel zwischen je zwei Whatman-Papieren gestapelt und für eine Stunde eine Spannung von 0.8 mA pro cm² Gel angelegt. Der Proteintransfer wurde mittels Tintenanfärbung kontrolliert und die Markerbanden markiert. Nach Entfärben der Membran mit 0.1 M NaOH (5 min) und dest. Wasser (30 min) wurde diese zweimal 10 min in TBS Puffer gewaschen und in Blocking Puffer (*Qiagen*) inkubiert (mind. 4 h, 200 rpm, RT). Anschließend wurde die Membran jeweils 10 min zweimal in TBST und einmal in TBS Puffer gewaschen und 1:3000 mit Penta His HRP Conjugate Antikörper (*Qiagen*) in Blocking Reagenz inkubiert (1 h, 200 rpm, RT). Die Membran wurde erneut zweimal mit TBST und einmal mit TBS Puffer gewaschen, etwas getrocknet, mit ECL Reagenz (Reagenz 1: Reagenz 2; 1+1; *GE Healthcare*) überschichtet und 1 min. inkubiert.

Zur Detektion wurde auf die Membran je nach gewünschter Intensität 30 s bis 2 min ein Röntgenfilm aufgelegt, dieser entwickelt und fixiert.

Blotpuffer	TBS Puffer	TBST Puffer
25 mM Tris	10 mM Tris/HCl, pH 7.5	20 mM Tris/HCl, pH 7.5
150 mM Glycin	150 mM NaCl	500 mM NaCl
10 % (v/v) Methanol		0.05% (v/v) Tween 20

Blocking Puffer	Tintenlösung
0.1 g Blocking Reagent	2 % (v/v) Tinte
20 ml 1 x Blocking Reagent Buffer	1 % (v/v) Essigsäure
200 µl 10% (v/v) Tween-20	
kurz erhitzen, abkühlen auf RT	

3.3.4. Bestimmung des Protein-Kofaktor-Verhältnisses

Die Absorptionsmessungen zur Bestimmung des Kofaktorgehaltes wurden mit dem Ultrospec 3100 pro (*GE Healthcare*) durchgeführt. Die Proteine bekannter Konzentration wurden hierbei in Gegenwart von 0.8 % (w/v) SDS, 0.1 M HCl für 15 min bei 65 °C oder 7.2 % (w/v) TCA für 1 h auf Eis denaturiert.^[149] Zur Bestimmung der tatsächlich in den Pufferbedingungen vorliegenden Extinktionskoeffizienten wurde mit freien Kofaktoren das gleiche Denaturierungsprotokoll durchgeführt. Nach Abtrennen des Niederschlages wurde vom Überstand ein Absorptionsspektrum im Bereich von 400 nm bis 500 nm aufgenommen, um zu überprüfen ob das Protein vollständig denaturiert war. Die Absorption des Kofaktors wurde bei seinem jeweiligen Absorptionsmaximum, unter Verwendung einer 10 mm Quarzküvette, gemessen und seine Konzentration mit den korrigierten Extinktionskoeffizienten (FAD_{TCA} : $\epsilon_{450} = 10220 \text{ m}^{-1}\text{cm}^{-1}$ $\text{FMN}_{\text{SDS/HCl}}$: $\epsilon_{448} = 10655 \text{ m}^{-1}\text{cm}^{-1}$;^[150] nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz berechnet.

$$E = \epsilon \cdot c \cdot l \quad (3.5)$$

3.3.5. CD-Spektroskopie

Die CD-Spektroskopie dient in erster Linie der Sekundärstrukturuntersuchung von Proteinen. Hierbei können aus einem CD-Spektrum (280 nm bis 190 nm) die relativen Mengen der Sekundärstrukturelemente abgeschätzt bzw. anhand von Schmelzkurven Veränderungen in der Proteinsekundärstruktur während des Denaturierungsprozesses beobachtet werden. Betrachtet man den nahen UV-Bereich (260 nm bis 320 nm), können Aussagen über Tryptophan-, Tyrosin-, Phenylalanin- und Cysteinreste in asymmetrischen Umgebungen und somit über die Tertiärstruktur des Proteins getätigt werden. Die Beobachtung des nahen UV- und VIS-Bereich (320 bis 700 nm) kann Aufschluss über die Umgebung und den Redoxzustand von Kofaktoren und Liganden geben.

CD-spektroskopische Untersuchungen wurden am Polarispektrometer J-810 mit einem PTC-423S Peltier Temperaturkontrollsystem (*Jasco*) durchgeführt. Für alle Messungen wurde eine Quarzküvette mit 1 mm Schichtdicke (*Hellma*) verwendet. Die CD-Spektren der Proteinlösungen zwischen 0.1 mg/mL und 0.35 mg/mL wurden bei 5 °C bzw. 20 °C im Wellenlängenbereich von 190 nm bis 280 nm aufgezeichnet.

Parameter	Einstellung
Messgeschwindigkeit	50 nm/min
Scan Modus	kontinuierlich
Datenintervall	0.1 nm
Response	2 s
Akkumulationen	3

Die Schmelzkurven wurden bei 207 nm aufgezeichnet. Hierzu wurde die Proteinlösung mit 2 °C/min von 5 °C bzw. 20 °C auf 95 °C erhitzt und nach 10 s bei 95 °C mit der gleichen Geschwindigkeit wieder auf die Starttemperatur abgekühlt.

Für CD-Spektren im nah UV- und VIS-Bereich wurden Proteinkonzentrationen von mindestens 2 bis 4 mg/mL verwendet. Die Spektren wurden von 600 nm bis 240 nm aufgezeichnet. Für Spektren von lichtadaptierten Zuständen wurde die Probe vor jeder Akkumulation belichtet, bei Dunkelspektren wurde sie zwischen zwei Akkumulationen 5 min im Dunkeln inkubiert.

Parameter	Einstellung
Messgeschwindigkeit	100 nm/min
Scan Modus	kontinuierlich
Datenintervall	0.2 nm
Response	2 s
Akkumulationen	10

3.3.6. EPR-Spektroskopie

Die EPR-Spektroskopie (EPR: Paramagnetische Elektron Resonanz) ist eine Hochfrequenzspektroskopiemethode, welche Einblicke in die Struktur und die Dynamik paramagnetischer Moleküle liefert.^[151-153] Um Proteine EPR spektroskopisch untersuchen zu können, sollten sie mindestens ein ungepaartes Elektron besitzen. Untersucht werden können demnach ihre Triplettzustände oder ihre radikalischen Spezies, die infolge von Elektronentransferprozessen entstehen.

Zeitaufgelöste EPR (tr-EPR) Experimente wurden mit einem selbstgebaute EPR-Spektrometer von Dr. Erik Schleicher (AK Weber, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg) durchgeführt. Das EPR-Spektrometer besteht aus einem Elektromagneten (*AEG*) und einer ER041 MR Mikrowellenbrücke, in Verbindung mit einem ER4118X-MD-5W1 Dielektrischem Resonator (*Bruker*), die in einem selbstgebaute Heliumgasflusskryostaten eingelassen sind. Die Proben temperatur wurde bis auf ± 1 K durch einen sich automatisch einstellenden Temperaturkontroller (*LakeShore Cryotronics 321*) überwacht. Die Mikrowellenfrequenz von 9.68 GHz wurde durch ein EIP 548 Frequenzzähler und das Magnetfeld durch ein ER035 MR NMR Gaussmeter (*Bruker*) gemessen. Das durch gepulste Laseranregung ausgelöste tr-EPR Signal wurde in einem schnellen geräuscharmen Vorverstärker verstärkt und direkt ohne Magnetfeldmodulation unter Verwendung eines digitalisierenden Oszilloskop (*Tektronix*) detektiert. Die Zeitaufösung des EPR-Spektrometers betrug 40-100 ns.^[154] Tr-EPR Signale im direktem Detektionsmodus besaßen eine nicht abgeleitete Funktion mit erweiterter absorbierender (A) und emittierender (E) Elektronenspinpolarisation. Ein vollständiger tr-EPR Datensatz bestand aus einer Reihe von transienten Signalen, die aus äquidistanten Magnetfeldpunkten des gesamten spektralen Bereichs übernommen wurden. Für verbesserte Signal-zu-Rausch Verhältnisse wurden im Allgemeinen je 25 transiente Signale pro Magnetfeldstärke akkumuliert.

Für die EPR-spektroskopischen Untersuchungen wurde eine 0.5 mM Proteinlösung in 60 % Glycerin unter Argon entgast, in eine EPR Quarzröhrchen (3 mm Innendurchmesser) überführt und im Dunkeln in flüssigen Stickstoff eingefroren.

Die Proteinproben wurden optisch mit einem Nd:YAG Laser (*Spectra Physics GCR*) bei einer Wellenlänge von 460 nm (Laserfarbstoff, Coumarin-120) angeregt, wobei die Pulsrate 1 Hz und die Pulsenergie 4 mJ/ Puls betrug.

Die EPR Spektren wurden mit einem Simulationsprogramm analysiert und die Spektren mit isotropischen g-Faktoren und dipolar gekoppelten Tensor D gefittet.^[155]

.

3.3.7. UV/VIS-Spektroskopie

Die UV/VIS-Spektren wurden mit dem UV-2401PC (*Shimadzu Corp.*) und dem HP 8453 Dioden-Array-Spektrometer (*Hewlett Packard*) im Bereich von 300 nm bis 700 nm gemessen. Es wurden UV/VIS Spektren der Proteinlösungen mit Konzentrationen zwischen 0.5 mg/mL und 4 mg/mL in Puffer A und B bei 15 °C bzw. 18 °C aufgenommen.

Vor Aufnahme eines Dunkelspektrums wurde die Proteinlösung mindestens 2 h auf Eis im Dunkeln inkubiert. Nach dieser Messung wurde das Protein 1 min mit der Weißlicht-LED-Lampe Liberty 100 (*Conrad*) direkt belichtet und ein Spektrum des lichtadaptierten Zustandes aufgezeichnet.

3.3.8. Herstellung verschiedener Redoxzustände des Flavins im Protein

Die vollständig reduzierte Form eines Proteins wurde nach Zugabe von 1 mM Natriumdithionit im Dunkeln oder durch Zugabe von 10 mM DTT und Bestrahlung mit Weißlicht (Diaprojektor Leitz Prado Universal (*Leitz*)) hergestellt. Des Weiteren wurde durch Bestrahlung mit Blaulicht einer Wellenlänge von 450 nm (1.45 mW/cm^2 , bestimmt mit dem Optometer P2000 (*Gigahertz Optik*)) die neutrale semichinoide gebundene Flavinspezies erhalten. Um die oxidierte Form zu erhalten wurden 50 μM Kaliumhexacyanoferrat (III) zu einer 25 μM Proteinlösung pipettiert.^[156] Der Fortschritt der jeweiligen Reaktion wurde UV/VIS spektroskopisch verfolgt.

3.3.9. Kinetikmessungen

Halbwertszeiten für die thermale Reversion zum dunkeladaptierten Zustand wurden mit dem J-810 Spectropolarimeter mit einem PTC- 423S Peltier Temperaturkontrollsystem (*Jasco*) bei

503 nm gemessen. Für die Dunkelkonversionen wurden 1 mg/mL Protein in einer Quarzküvette mit 2 mm Schichtdicke verwendet. Die Kinetiken wurden bei Temperaturen zwischen 276 und 297 K bestimmt. Vor Beginn der Messung wurden die Proben 1 min mit einer Weisslicht-LED-Lampe Liberty 100 (*Conrad*) direkt belichtet. Im Interval Scan Modus wurde nach jeweils 15 s 30 s, 60 s, 120 s bzw. 300 s über einen an das jeweilige Protein und Temperatur angepassten Zeitraum von 3.5 min bis 3 h die Absorption verfolgt. Aus den zeitabhängigen Daten wurden die Halbwertszeiten mit einer monoexponentiellen Zerfallsfunktion in Origin (*OriginLab Corporation*) gefittet und bestimmt.

3.3.10. Gelshift-Assay

Mit dieser Methode sollten Protein-DNA-Bindungsstudien durchgeführt werden, um so Bindungskonstanten zu erhalten. Des Weiteren sollten auf diese Art Änderungen im Bindungsverhalten an den CPD-Schaden oder zu ungeschädigter DNA analysiert werden.

Die native PAGE wurde mit dem PROTEAN II xi System (*Bio-rad*) durchgeführt. Zunächst wurde ein natives 5 % Polyacrylamidgel nach folgendem Rezept gegossen:

Rotiphoresegel A (30 %ige Acrylamidlösung)	10 mL
Rotiphoresegel B (2 %ige Bisacrylamidlösung)	4 mL
10 x TBE	1.5 mL
Milli Q Wasser	43.84 mL
TEMED	60 µL
10 % (w/v) APS	660 µL

Für spezifische DNA-Bindungsstudien wurden zur Hybridisierung unter grünem Sicherheitslicht je 20 nM Oligonukleotid LAMRA* (CPD-haltig oder ungeschädigt) und 2 mM CT-50 für 5 min auf 95 °C erhitzt und mit 1 °C/min auf RT abgekühlt. Analog dazu erfolgte für die Bestimmung der Dissoziationskonstanten die Hybridisierung von 20 nM LAMRA* (CPD-haltig oder ungeschädigt) mit 20 nM CT-50. Im Anschluss wurden die Reaktionsansätze unter rotem Sicherheitslicht wie in folgender Tabelle beschrieben auf Eis zusammenpipettiert und im Dunkeln 30 min inkubiert.

Reaktionsansatz für spezifische Bindungsstudien

Hybridisiertes Oligonukleotid (20 nM)	1 µL
Protein (1 µM)	1 µL
5 x Puffer	2 µL
Milli Q Wasser	6 µL

Für die Bestimmung der Dissoziationskonstanten wurden finale Proteinkonzentrationen von 0, 2, 5, 10, 20, 50, 100 und 200 nM verwendet.

Der 5 x Puffer wurde jeweils so angepasst, dass die folgenden Reaktionsbedingungen erhalten wurden:

Pufferbedingungen

15 mM Tris/ Na₂HPO₄, pH 7.5
 20 mM NaCl
 50 µg/ mL BSA
 10 % (v/v) Glycerin
 0.1 mM EDTA

Die Reaktionsansätze konnten direkt auf das Gel aufgetragen werden. Zum Ermitteln des Auftrennungsbereiches wurde der 10 x Orange Loading Dye (*LI-COR*) verwendet. Die Auftrennung im nativen Gel erfolgte 1 h bei 200 V in 0.25 x TBE Puffer. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel mit dem Odyssey Infrared Imaging System (*LI-COR Biosciences*) eingescannt und mit der Software Odyssey 3.0 (*LI-COR Biosciences*) analysiert.

3.3.11. DNA-Reparatur-Assay

Mit dieser Analysemethode sollte überprüft werden, ob die zu analysierenden Proteine in der Lage waren, den im verwendeten Oligonukleotid enthaltenen CPD-Schaden nicht nur spezifisch zu binden, sondern auch zu reparieren.

Für die Verwendung von doppelsträngiger DNA wurden zunächst das den CPD-Schaden enthaltende Oligonukleotide LAMRA* und ein 100-facher Überschuss des komplementären Stranges CT-50 unter grünem Sicherheitslicht hybridisiert. Analog dazu wurden zur Herstellung eines an vier Basen nicht komplementären DNA Doppelstranges das CPD-haltige Oligonukleotid LAMRA* und das OligoCT-40_CS4 im Verhältnis 1:1 hybridisiert.

Ein typischer Hybridisierungsansatz bestand aus:

200 nM OligoLAMRA	1.2 µL
10 µM OligoCT-50 / 100 nM OligoCT-40_CS4	2.4 µL
10 x Puffer O	2 µL
Nukleasefreies Wasser	ad 20 µL
Inkubation	95 °C, 5 min → 1 °C/ min auf RT abkühlen

In der Zwischenzeit wurde das Protein in Puffer G durch Zugabe von 10 mM Natriumdithionit und 30 min Inkubieren im Dunkeln reduziert. Im Anschluss wurde unter Sicherheitsrotlicht zu dem doppelsträngigem Oligonukleotid das zu untersuchende Protein gegeben und der Reparaturansatz 30 min im Dunkeln auf Eis inkubiert.

Der Reparaturansatz wurde folgt zusammenpipettiert:

Hybridisierungsansatz	20 µL
10 mg/ mL BSA	0.2 µL
10 x Puffer O	10 µL
20 % (v/v) Glycerin	60 µL
1 M DTT	1.2 µL
10 µM Proteinlösung	1.2 µL
Nukleasefreies Wasser	ad 120 µL
Inkubation	30 min auf Eis

Puffer G

50 mM Tris/ Na₂HPO₄, pH 7.5
 200 mM NaCl
 10 mM Natriumdithionit
 10 % (v/v) Glycerin

Nach dem Inkubationsschritt wurde dieser Reaktionsansatz in eine Ultra-Mikro Fluoreszenzküvette mit 10 mm Schichtdicke (*Hellma*) pipettiert und eine Stunde mit Licht der Wellenlänge von 365 nm (2.4 mW/cm^2) belichtet. Vor der Belichtung, nach 10 min, 30 min und 1 h wurden je 20 μL Probe entnommen und das Protein 10 min bei 95 °C inaktiviert. Diese Reparaturansätze wurden kurz abgekühlt und für die weitere Verwendung bei -20 °C gelagert.

Zur Differenzierung des reparierten vom geschädigten Oligonukleotid sollte ein *VspI*-Verdau durchgeführt werden. Zuvor wurden die im Reparaturansatz enthaltenen Oligonukleotide erneut hybridisiert (5 min, 95 °C \rightarrow 1 °C/ min auf RT abkühlen). Nach der Hybridisierung wurden die Reparaturansätze geteilt und zu den Ansätzen, die den nicht vollständig komplementären DNA Doppelstrang enthielten 200 nM Oligo CT-50 hinzupipettiert. Anschließend wurden zu je einem Ansatz *VspI* und zum anderen als Kontrollreaktion nukleasefreies Wasser pipettiert.

Der Ansatz für den *VspI*- Verdau wurde wie nachfolgend aufgeführt zusammenpipettiert:

Reparaturansatz	10 μL / 12 μL
10 x Puffer O	1 μL
10 mg / mL BSA	0.1 μL
<i>VspI</i> (10 U/ μL) / Nukleasefreies Wasser	1 μL
Nukleasefreies Wasser	ad 20 μL
Inkubation	37 °C, 45 min
Inaktivierung	65 °C, 20 min

Zur Auftrennung der verdauten Reparaturansätze wurde ein denaturierendes 6 % Polyacrylamidgel mit Harnstoff benutzt. Die Gele wurden wie in Abschnitt 3.1.14.2 beschrieben gegossen, elektrophoretisch aufgetrennt, dokumentiert und analysiert.

3.4. Proteinkristallisation

Bei unbekannten Kristallisationsbedingungen wurden zunächst mehrere Sparse Matrix Screens (*Qiagen*) auspipettiert. Diese Screens enthalten empirisch zusammengefasst die Parameter bekannter oder veröffentlichter Kristallisationsbedingungen,^[157] so dass viele

Bedingungen mit relativ wenig Protein abgedeckt werden können. Durch Verwenden dieser Kristallisationsbedingungen erhält man mit zum Teil geringem Aufwand reproduzierbare Kristalle und ist in der Lage, gute Aussagen zum Kristallisationsverhalten eines Proteins unter bestimmten Bedingungen zu machen. Kristallisationsbedingungen, unter denen Kristallwachstum auftritt, lassen sich durch grobes oder feines Rasterscreening oder durch Seeding optimieren. Hierbei wurden die Salz- und Präzipitanzkonzentration, sowie die Pufferbedingung, bis zum Erhalt regelmäßiger und ausreichend großer Kristalle für die Röntgendiffraktion variiert.

Zu den am häufigsten angewendeten Kristallisationsmethoden gehören Hanging Drop, Sitting Drop, die Kristallisation unter Öl, in einer Kapillare und die Mikrodialyse.

3.4.1. Kristallisationsscreening

Die Kristallisationsscreenings wurden als Sitting Drop im 96 well Format mit dem Cartesian MicrosysTM SQ4000 (*Genomic Solutions*) auspipettiert. Bei dieser Methode sind die Partialdrücke des Wassers in Reservoir und Tropfen unterschiedlich, so dass im Tropfen Wasser bis zum Erreichen eines Gleichgewichts verdampft. Während dieses Prozesses erhöhen sich die Protein- und Fällungsmittelkonzentrationen, was durch auftretende Einsalzbeziehungswise Aussalzeffekte die Löslichkeit des Proteins erhöhen oder verringern kann. Hierbei kann, verursacht durch höhere Fällungsmittelkonzentration, ein ungeordnetes Präzipitieren des Proteins oder im Idealfall die Nukleation des Proteins und anschließendes Kristallwachstum beobachtet werden.

Es wurden aus 80 µL Reservoirlösung 300 nL der jeweiligen Kristallisationsbedingung mit 300 nL Proteinlösung ggf. unter Sicherheitslichtbedingungen zusammenpipettiert. Dabei wurden folgende Screens verwendet: Sigma Basic, Extension, Cryo und Nextal Classics Suite, Classics Lite Suite, PACT, JCSG, MBClassI Suite, MBClassII Suite, Cryos Suite, Anions Suite. Kristallisationsansätze wurden bei 4 °C bzw. 18 °C inkubiert. Die Dokumentation der Kristallisationsansätze erfolgte nach einem Tag, 3 bis 4 Tagen, einer Woche, dann wöchentlich und nach 1 Monat monatlich jedoch mindestens ein Jahr lang.

3.4.2. Optimierung der Proteinkristallisation

Die Optimierung der jeweiligen Bedingung wurde ebenfalls im 96 well Format und bei der entsprechenden Temperatur ggf. unter Sicherheitsbedingungen durchgeführt. Im 96 well

Format wurden zu 500 nL ReservoirLösung 500 nL ProteinLösung pipettiert. Optimierungen im 24 well Format wurden im Hanging Drop durchgeführt. Hierbei wurde aus 750 μ L ReservoirLösung 1 μ L auf ein silanisiertes Deckgläschen pipettiert und 1 μ L ProteinLösung hinzugefügt. Die Kristallisationsansätze wurden nach einem Tag, einer Woche, dann wöchentlich und nach 1 Monat monatlich überprüft.

3.4.3. Cokristallisation

Das Ziel dieser Kristallisationsmethode ist es, das Protein mit seinem gebundenen Substrat zu kristallisieren und dieses so direkt in die Kristallstruktur einzubauen. Auf diese Weise ist es möglich, Aussagen über die Wechselwirkungen mit dem Protein und daraus folgend eventuell den Reaktionsmechanismus des Enzyms abzuleiten.

Zusätzlich zur ProteinLösung und der Kristallisationsbedingung ist im Tropfen eine dem Protein angepasste Substratmenge enthalten. Bei dieser Methode können sich wesentliche Faktoren wie Zellparameter und Raumgruppe der Kristalle im Vergleich zum reinen Proteinkristall maßgeblich ändern, und somit zu einer Verbesserung der Auflösung des Kristalls führen. Durch Hinzufügen des Substrates kann sich auch die Kristallisationsbedingungen des Proteins verbessern und die Kristallbildung fördern.

Zunächst wurde das Protein mit dem (6-4)-Schaden enthaltenem doppelsträngigen Oligonukleotid (5'-ACAGCGGT(6-4)TGCAGGT-3') im Verhältnis 1:1.25 über Nacht inkubiert. Anschließend wurde die Kristallisation analog zu Abschnitt 3.4.1 durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1. Veränderung der photochemischen Eigenschaften der *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF Domäne in Richtung kurzer BLUF Domänen

Das *Escherichia coli* Genprodukt YcgF (403 aa, Molekulargewicht 45.3 kDa, Swiss-Prot Eintrag P75990) besteht aus einer N-terminalen BLUF-Photorezeptordomäne (L2-L97) und einer C-terminalen EAL-Domäne (P145–K403). Beide Domänen sind durch eine vorwiegend α -helikale Linkerregion (R98–I144) miteinander verbunden. Dies konnte anhand von Sekundärstrukturvorhersagen mit dem Jpred Server (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/~www-jpred/>) ermittelt werden (Abb. 4.1).

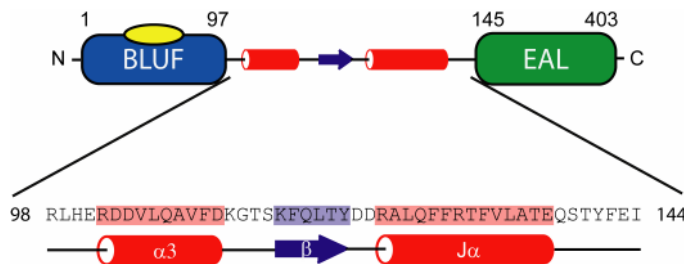


Abbildung 4.1: Domänenaufbau von *E. coli* YcgF. Die Sekundärstrukturelemente der Linkerregion wurden mit dem Jpred Server (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/~www-jpred/>) vorhergesagt. Die α -Helices sind in Form von roten Zylindern und β -Faltblätter mit blauen Pfeilen dargestellt.

Die *E. coli* YcgF BLUF-Domäne besitzt im Vergleich zu den SyPixD, BlrB und TePixD BLUF-Domänen im dunkel- sowie im lichtadaptiertem Zustand ein blauverschobenes Absorptionsmaximum bei 461 bzw. 465 nm, eine kleinere blaulichtinduzierte Rotverschiebung und einen stark stabilisierten Signalzustand.^[1-5] Zusätzlich weist der Flavintriplettzustand der YcgF BLUF-Domäne ein charakteristisches asymmetrisches EPR Signal auf.^[52] Diese besonderen photochemischen Eigenschaften der *E. coli* YcgF BLUF-Domäne deuten darauf hin, dass in der Familie der BLUF-Domänen enthaltenden Proteine zwei Subtypen existieren, den Subtyp I (SyPixD) und Subtyp II (YcgF).

Ein multiples Sequenzalignment der *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domäne mit den *Synechocystis* sp SyPixD, *T. elongatus* TePixD, *K. pneumoniae* BlrP1 und den *R. sphaeroides* BlrB und AppA Blaulichtrezeptoren zeigt einerseits den in allen BLUF-Blaulichtrezeptoren hochkonservierten Tyrosinrest 7. Andererseits verdeutlicht es, dass die meisten BLUF-

Domänen, mit Ausnahme von *K. pneumoniae* BlrP1, anstelle der Methionin- und Alaninreste an den Positionen 23 bzw. 90 ein Isoleucin bzw. Tryptophan besitzen. Zur Charakterisierung dieser drei Aminosäurereste wurden, ausgehend vom *E. coli* YcgF-(1-137) Blaulichtrezeptor, die in Tabelle 4.1 aufgeführten Oberflächenmutanten hergestellt (Abb. 4.3). YcgF-(1-137) besteht zusätzlich zur BLUF-Domäne aus einem putativen α -helikalen Segment (J α : R124-E137), welches als einheitliche Linker-Helix zwischen der BLUF- und EAL-Domäne von YcgF fungieren kann.^[45] Dies zeigte ein Vergleich von bekannten 3D Strukturen verschiedener BLUF Domänen (Abb. 4.2).

Die Produktion und Untersuchung der beschriebenen Oberflächenmutanten soll helfen die beschriebenen photochemischen Besonderheiten der YcgF-(1-137) BLUF-Domäne zu charakterisieren, bzw. ihre subtypischen Eigenschaften in Richtung des alleinstehenden SyPixD BLUF-Domänen enthaltenden Proteins zu verändern.

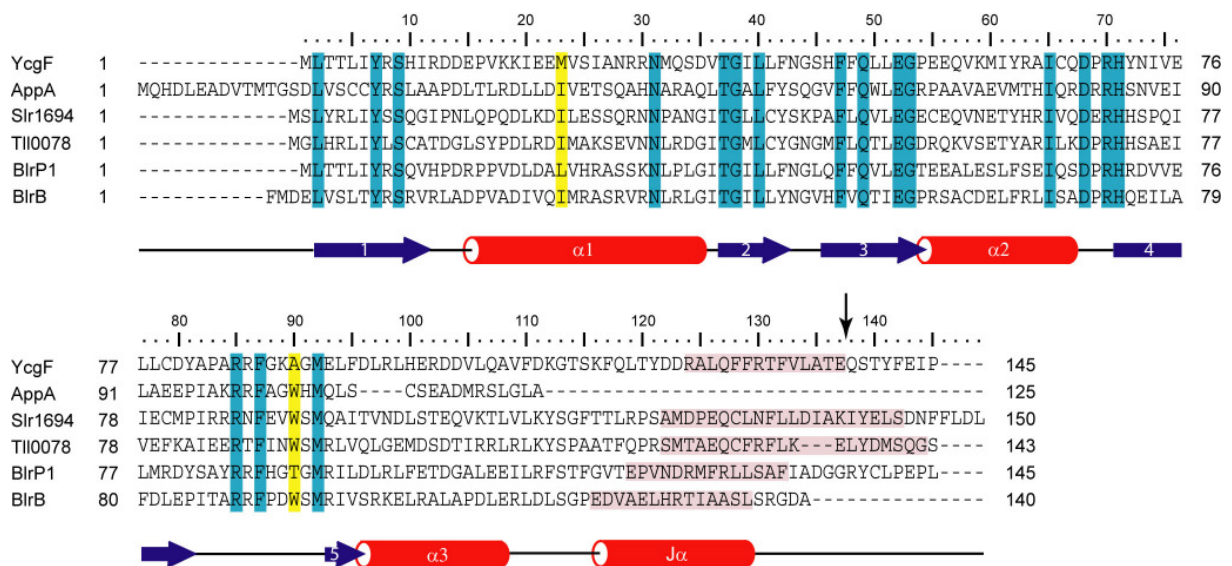


Abbildung 4.2: Multiples Sequenzalignment von BLUF-Domänen enthaltenden Photorezeptoren. Das Sequenzalignment wurde mit ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/>) generiert. Die gezeigten Sekundärstrukturelemente entsprechen der Struktur von *R. sphaeroides* BlrB (PDB ID: 2BYC; Kette B), das zur selben Unterfamilie wie das *E. coli* Genprodukt YcgF gehört.^[3] Die Sekundärstrukturelemente sind analog zu Abb. 4.1 dargestellt. Der schwarze Pfeil kennzeichnet den C-terminalen Aminosäurerest der analysierten YcgF BLUF-Domäne. In pink hervorgehoben sind die der YcgF J α -Helix entsprechenden α -Helices aller BLUF-Domänen Strukturen. In allen Sequenzen konservierte Aminosäurereste sind hellblau unterlegt und die Positionen der konservierten Isoleucin- und Tryptophanreste, die in der YcgF BLUF-Domäne fehlen und durch ein Met 23 bzw. Ala 90 ersetzt wurden, sind gelb hervorgehoben. *E. coli* YcgF (P75990); *R. sphaeroides* BlrB (Q3IYE4); *R. sphaeroides* AppA, ein auf 1–125 Aminosäuren verkürztes C-terminales Fragment, (Q53119); SyPixD aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 (P74295); TePixD aus *T. elongatus* BP-1 (Q8DMN3), BlrP1 aus *K. pneumoniae* (B5XQZ5).

BLUF-Domänenmutante	Funktion bzw. Eigenschaft der ausgetauschten Aminosäure
YcgF-(1-137)_Y7F	Beteiligung am Elektronen- bzw. Protonentransfer, sowie Teil des FAD [•] -Tyr [•] - Radikalpaares
YcgF-(1-137)_M23I	Interaktion seines Schwefelatoms mit dem Flavinisalloxazinring
YcgF-(1-137)_M23L	
YcgF-(1-137)_A90W	evtl. keine 180° Rotation bzw. Tautomerisierung des konservierten Glutaminrestes 49
YcgF-(1-137)_M23I_A90W	siehe entsprechende Einzelmутanten

Tabelle 4.1: Generierte YcgF-(1-137) BLUF-Domänenmutanten und erwartete Funktion bzw. Eigenschaften der jeweiligen ausgetauschten Aminosäure.

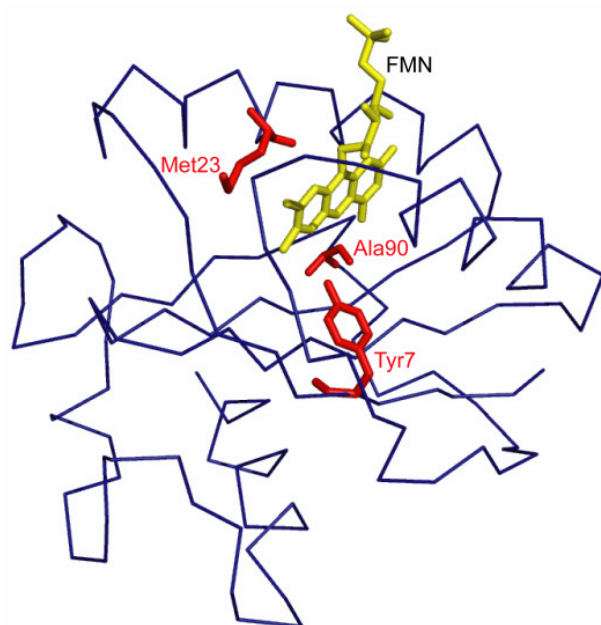


Abbildung 4.3: Bändermodell der *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domäne. Das 3D-Modell wurde anhand der *R. sphaeroides* BlrB Kristallstruktur (PDB ID: 2bycB) mit dem Server SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) im *First Approach Mode* generiert.^[158] Dargestellt sind die ausgetauschten nativen Aminosäurereste (rot) und der FMN-Chromophor (gelb) des *E. coli* YcgF-(1-137).

4.1.1. Produktion und Aufreinigung der verschiedenen Mutanten der YcgF-(1-137) BLUF-Domäne

Die Einzelmутanten Y7F, M23I, M23L und A90W der *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domäne wurden durch gerichtete Mutagenese unter Verwendung von in Abschnitt 3.1.3 beschriebenen Standardprotokollen mit der Phusion Polymerase von Manuel Maestre Reyna,^[159] Petra Gnau und Martina Lenz hergestellt. Die Mutagenese wurde mit dem Templat pET36-YcgF-(1-137)^[52] und den unter Abschnitt 2.5.1.2 in Tabelle 2.5 aufgelisteten Primern durchgeführt.

Die M23I_A90W Doppelmutante wurde durch präparativen Verdau mit *Bam*HI und *Sph*I und anschließender Ligation aus den M23I und A90W Einzelmutanten kloniert.

Die erhaltenen Mutanten der *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domäne wurden durch analytische Restriktionsverdaue mit *Pvu*I (M23I und M23L) und *Xho*I (A90W) unter Verwendung der eingefügten Restriktionsschnittstellen analysiert und durch DNA-Sequenzanalyse verifiziert.

Die rekombinante Expression und Aufreinigung der verschiedenen *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domänenmutanten Y7F, M23I, M23L, A90W und M23I_A90W wurde analog zum Wildtyp unter leicht modifizierten Pufferbedingungen durchgeführt.^[5, 6]

Die Produktion der unlöslichen *Inclusion Bodies* der *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domäne bzw. ihrer Mutanten erfolgte in 2 L LB-Medium bei 37 °C durch Induktion mit 1 mM IPTG. Als Expressionsstamm wurde *E. coli* BL21-Gold (DE3) verwendet, wobei die Transformation von chemisch kompetenten Zellen erfolgte. Nach zweistündiger Expression wurden die Zellen geerntet, in Puffer A resuspendiert und bis zur Weiterverwendung bei -80 °C eingefroren. Die durch den Zellaufschluss mit Lysozym erhaltenen *Inclusion Bodies* wurden in Gegenwart von LDAO, EDTA und PMSF gewaschen und so von zelleigener DNA, Proteasen und löslichen Proteinen befreit, die bei der anschließenden Rückfaltung der *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domäne und ihrer Mutanten hinderlich sein könnten. Für die Rückfaltung der *Inclusion Bodies* dieser BLUF-Photorezeptoren wurde FMN anstelle des nativen Chromophors FAD verwendet, da für den YcgF-(1-137) Wildtyp bei der Rückfaltung in Gegenwart von FMN reproduzierbare Ausbeuten von ~ 100 % beobachtet werden konnten. Zum homogenen Einbau des Flavinchromophors wurden die in 6 M GdnHCl und 100 mM DTT enthaltendem Puffer A gelösten *E. coli* BLUF-Domänenvarianten in Gegenwart eines 15-fachen Überschuss an FMN zurückgefaltet. Über einen Zeitraum von 1.5 Tagen wurde die native YcgF-(1-137) Lösung gegen Puffer C und die Lösungen der jeweiligen BLUF-Domänenmutante gegen Puffer A dialysiert.

Unter Verwendung dieses Protokolls konnten neben der nativen *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domäne auch ihre Einzelmutanten Y7F, M23I, M23L und A90W und die M23I_A90W Doppelmutante erfolgreich zurückgefaltet werden. Zwar konnten die Rückfaltungsausbeuten des Wildtyps nicht erreicht werden, dennoch wurden für die Einzelmutanten 40 % bis 74 %, zunehmend von M23I über M23L, A90W bis zu Y7F, und für die M23I_A90W Doppelmutante ca. 14 % zurückgefaltete *E. coli* BLUF-Domäne erhalten (Tab. 4.2). Ursache für die niedrigeren Rückfaltungsausbeuten der YcgF-(1-137) Mutanten könnten fehlende Wasserstoffbrückenbindungen sein, deren Abwesenheit auf das mutationsbedingte Einfügen

der aliphatischen und aromatischen Aminosäuren Isoleucin, Leucin und Phenylalanin zurückzuführen ist. Der eingefügte Tryptophanrest hingegen könnte den Rückfaltungsprozess zwar durch π - π Stapelwechselwirkungen fördern, behindert diesen jedoch möglicherweise stärker durch größenbedingte sterische Effekte.

BLUF-Domäne	Rückfaltungsausbeuten
YcgF-(1-137)_Y7F	74 %
YcgF-(1-137)_M23I	41 %
YcgF-(1-137)_M23L	48 %
YcgF-(1-137)_A90W	53 %
YcgF-(1-137)_M23I_A90W	14 %
YcgF-(1-137)_WT	97 %

Tabelle 4.2: Maximale Rückfaltungsausbeuten der verschiedenen *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domänen.

Alle *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domänen wurden durch Ultrafiltration auf einem Konzentrator mit einem Ausschlussvolumen von 10 kDa ankonzentriert. Im Anschluss wurden durch Größenausschlusschromatographie mit einer Superdex 200 XK 16/70 Säule letzte Verunreinigungen abgetrennt und die Blaulichtrezeptoren in Puffer A aufgereinigt. Alle Mutanten der *E. coli* BLUF-Domäne wurden mit einem dem Monomer entsprechendem apparentem Molekulargewicht von der Säule eluiert, anstatt des für den Wildtyp YcgF-(1-137) beobachteten Dimers (Abb. 4.4). Diese Veränderung des oligomeren Zustands der mutierten YcgF BLUF-Domänen wird möglicherweise durch fehlende im Wildtyp auftretende Wechselwirkungen verursacht, welche durch die Mutationen des Tyrosin 7, Methionin 23 und Alanin 90 gestört wurden.

Die *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domänenmutanten, Y7F, M23I, M23L, A90W und M23I_A90W, konnten in der gleichen Reinheit wie der Wildtyp und in ausreichenden Mengen aufgereinigt werden, wobei mit der Anzahl der Mutationen die Ausbeuten vom WT ausgehend über M23L, M23I, A90W, Y7F, bis hin zu M23I_A90W abnahmen (Abb. 4.4, Tab. 4.3).

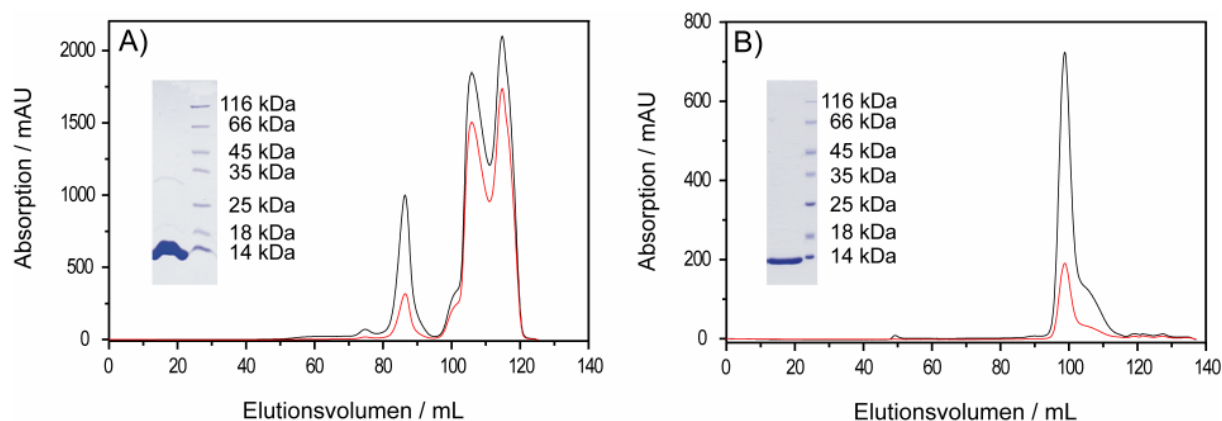


Abbildung 4.4: Elutionsprofile der Größenausschlusschromatographie zweier mit FMN rekonstituierter *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domänen. Für die Chromatographie wurde eine Superdex 200 XK 16/ 70 Säule verwendet. Die Elution wurde bei 280 nm (schwarz) und 445 nm (rot) detektiert. A) Der aufgetragene YcgF-(1-137) Wildtyp wurde bei einem R_f von 0.75 CV und einem $OD_{445/280}$ Quotienten von 0.31 und B) die YcgF-(1-137)_A90W Mutante mit einem R_f von 0.8 CV und einem $OD_{445/280}$ Quotienten von 0.33 von der Säule eluiert. Der Doppelpeak im Bereich von 100 bis 120 mL im Elutionsprofil des Wildtyps zeigt die Elution des überschüssigen FMN Chromophors. Schwarze Pfeile kennzeichnen die Elution der jeweiligen BLUF-Domäne. Eingebettet sind die 15 % SDS-PAGE Gele beider zurückgefalteten und aufgereinigten YcgF BLUF-Domänen zu sehen.

Die aufgereinigten Mutanten der *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domäne wiesen alle mit Ausnahme des grün gefärbten Y7F die typische dem oxidierten FMN-Zustand entsprechende gelbe Färbung auf (Abb. 4.5). Die Grünfärbung der Y7F-Mutanten deutet auf einen anteiligen blauen, neutralen semichinoiden Zustand des gebundenen FMN und somit auf eine leichte Destabilisierung der oxidierten Form hin.

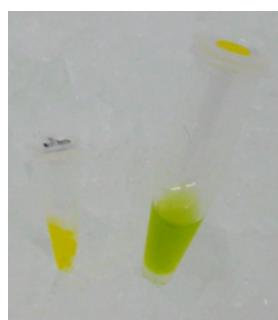


Abbildung 4.5: Aufgereinigte *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domänen. Links: Wildtyp, rechts: Y7F-Mutante.

Als Indiz für eine quantitative homogene Rückfaltung und Aktivität der jeweiligen *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Photorezeptoren wurden ihre $OD_{445/280}$ Quotienten und Protein/Chromophor Verhältnisse bestimmt. Hierbei konnten für die Mutanten dem nativen YcgF-(1-137) ähnliche $OD_{445/280}$ Quotienten im Bereich von ~ 0.32 ermittelt werden (Tab. 4.3). Der etwas geringere Wert der Y7F-Mutante von $OD_{445/280} = 0.26$ korreliert mit dem partiellen Vorhandensein der neutralen semichinoiden FMN Form und der daraus

resultierendem Verringerung des Absorptionsmaximums des oxidierten FMN Zustandes im Bereich von 450 nm.

Für die Bestimmung der Protein/ Chromophor-Verhältnisse wurde die jeweilige BLUF-Domäne bekannter Konzentration denaturiert, die Absorption des freigesetzten FMN bei 450 nm gemessen und so dessen Konzentration ermittelt. Sowohl für den Wildtyp als auch für die Mutanten der *E. coli* YcgF BLUF-Domänen wurden Verhältnisse von ungefähr 1:1 bestimmt, die zeigen, dass durch die Mutagenese keine für den FMN Einbau benötigten Wechselwirkungen gestört wurden (Tab. 4.3).

BLUF-Domäne	Proteinmenge	OD _{445/280}	Protein/ Chromophor Verhältnis
YcgF-(1-137)_Y7F	15 mg / L	0.26	1 : 0.92
YcgF-(1-137)_M23I	26 mg / L	0.35	1 : 0.89
YcgF-(1-137)_M23L	43 mg / L	0.35	1 : 0.93
YcgF-(1-137)_A90W	22 mg / L	0.33	1 : 0.95
YcgF-(1-137)_M23I_A90W	10 mg / L	0.29	1 : 1.04
YcgF-(1-137)_WT	65 mg / L	0.32	1 : 0.98

Tabelle 4.3: Aufgereinigte Proteinmenge pro Liter *E. coli* Kultur, OD_{445/280} Quotienten und Protein/ Chromophor Verhältnisse der verschiedenen mit FMN rekonstituierten und aufgereinigten *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domänen.

4.1.2. Untersuchung der nativen Faltung und Proteinstabilität der Mutanten der *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domäne

Für die Untersuchung des Faltungsverhaltens und der Proteinstabilität der *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domänen wurden CD-spektroskopische Untersuchungen durchgeführt. Zunächst wurden CD-Spektren der fern-UV Region aufgenommen, um den Gehalt der vorhandenen Sekundärstrukturelemente bestimmen zu können.

Ein Vergleich der CD-Spektren der untersuchten lichtadaptierten *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domänen im Bereich von 260 bis 190 nm zeigt keine durch den Austausch der nativen Aminosäuren bedingten signifikanten Unterschiede im Faltungsverhalten ihrer α -Helices und β -Faltblätter (Abb. 4.6). Demnach besitzen alle Mutanten der YcgF-(1-137) BLUF-Domäne genauso wie die native Struktur ein α -Helix/ β -Faltblatt Verhältnis von ~ 65 zu 35 %.

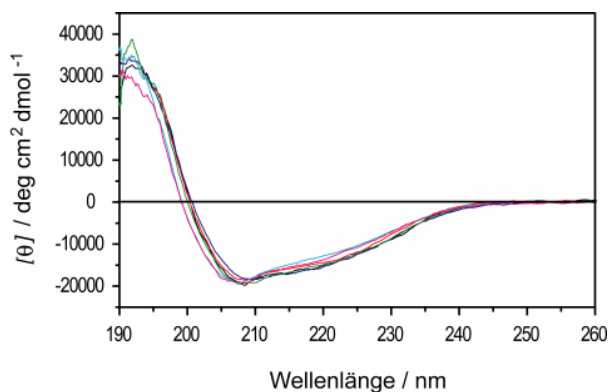


Abbildung 4.6: CD-Spektren der verschiedenen lichtadaptierten *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domänen. YcgF-(1-137) (schwarz), YcgF-(1-137)_Y7F (blau), YcgF-(1-137)_M23I (rot), YcgF-(1-137)_M23L (grün), YcgF-(1-137)_A90W (hellblau) und YcgF-(1-137)_M23I_A90W (pink). Die mit FMN rekonstituierten BLUF-Domänen waren in 2 mM Tris/HCl, 20 mM NaCl, pH 8.0 gelöst, die Spektren wurden bei 20 °C aufgenommen und je drei Spektren akkumuliert.

Die von den Mutanten der *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domäne bei 207 nm aufgenommenen Schmelzkurven zeigten, ähnlich dem Wildtyp, ein kooperatives Denaturierungsverhalten beim Erhitzen auf 95 °C (Abb. 4.7 und 4.8). Unter langsamem Abkühlen falteten sich die BLUF-Domänen nicht wieder zurück und unterlagen folglich einem außerordentlich starken Hystereseeffekt.

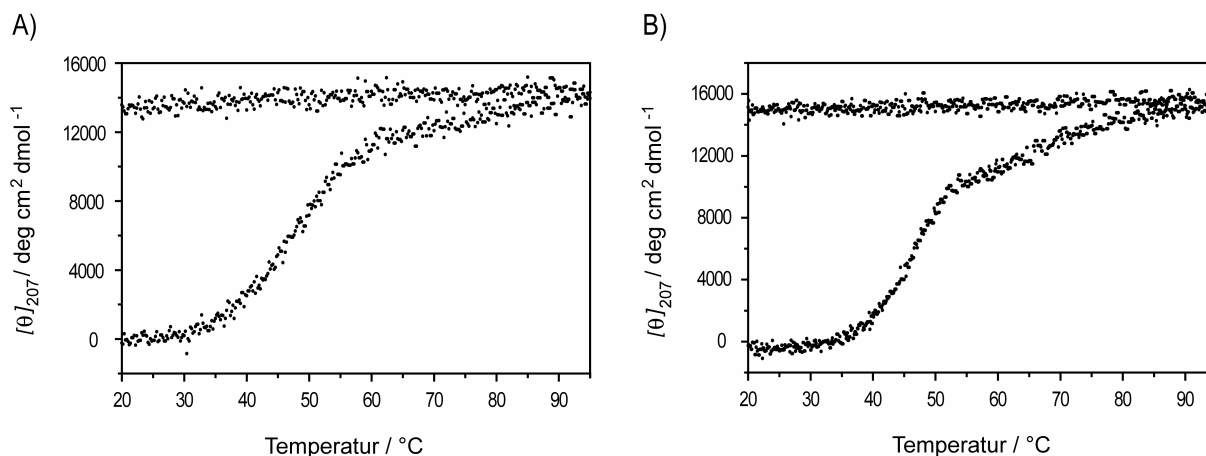


Abbildung 4.7: Schmelzkurven der mit FMN rekonstituierten A) YcgF-(1-137) und B) YcgF-(1-137)_A90W BLUF-Domänen. Die BLUF-Domänen waren in 2 mM Tris/HCl, 20 mM NaCl, pH 8.0 gelöst und die Schmelzkurven wurden bei 207 nm von 20 °C bis 95 °C mit 2 °C/ min aufgenommen.

Beim Vergleich der Schmelzkurven untereinander fällt auf, dass die *E. coli* YcgF BLUF-Domänen bei unterschiedlichen Temperaturen denaturieren, bzw. ihre

Sekundärstrukturelemente unterschiedlich vollständig entfaltet werden (Abb. 4.8). So weisen der Wildtyp und die M23I, M23L und A90W Mutanten des YcgF-(1-137) einen gemeinsamen Schmelzpunkt von $\sim 48^\circ\text{C}$ auf. Hierbei scheint jedoch das YcgF-(1-137)_M23L in diesem Temperaturbereich über einen einstufigen Denaturierungsprozess vollständig zu entfalten. Im Vergleich dazu sind einige isolierte Bereiche des Wildtyp und der M23I und A90W BLUF-Mutanten bei dieser Temperatur noch teilweise stabilisiert und denaturieren erst bei weiterer Temperaturerhöhung über mehrere Zwischenzustände nahezu vollständig. Demnach scheint der Austausch entweder des Methionin 23 oder des Alanin 90 und die daran geknüpften lokalen Änderungen im Wasserstoffbrückennetzwerk bzw. sterischen Veränderungen keinen negativen Einfluss auf die Stabilität der residualen Sekundärstrukturelemente zu besitzen. Aus diesem Grund scheinen sowohl das Methionin 23 als auch das Alanin 90 zumindest nicht unmittelbar an der Stabilisierung der nativen BLUF-Domäne beteiligt zu sein.

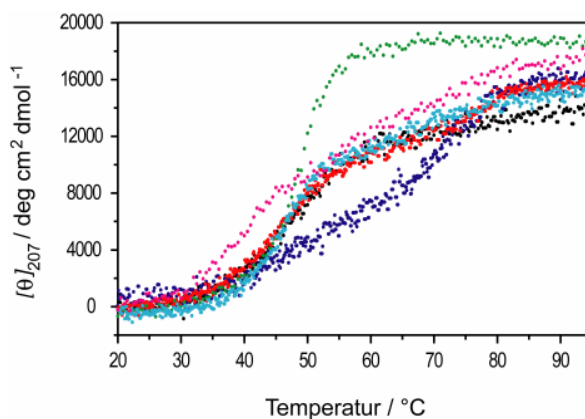


Abbildung 4.8: Schmelzkurven der verschiedenen *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domänen. YcgF-(1-137) (schwarz), YcgF-(1-137)_Y7F (blau), YcgF-(1-137)_M23I (rot), YcgF-(1-137)_M23L (grün), YcgF-(1-137)_A90W (hellblau) und YcgF-(1-137)_M23I_A90W (pink). Die mit FMN rekonstituierten BLUF-Domänen befanden sich in 2 mM Tris/HCl, 20 mM NaCl, pH 8.0 und die Schmelzkurven wurden bei 207 nm von 20 °C bis 95 °C mit 2 °C/ min aufgenommen.

Die *E. coli* YcgF-(1-137)_Y7F BLUF-Domäne denaturiert ebenfalls über einen mehrstufigen Prozess, der ähnlich dem Wildtyp bei ca. 35 °C beginnt. Im Gegensatz zur nativen YcgF-(1-137) BLUF-Domäne repräsentiert sie jedoch einen erhöhten Schmelzpunkt von 60 °C. Diesem mehrstufigen Denaturierungsprozess könnten eine nichtkooperative Entfaltung einiger isolierter α -helikaler Bereiche und/ oder eine residuale Bindung des FMN-Chromophors verursachen. Die genaue Ursache ist jedoch mit dieser CD-spektroskopischen

Untersuchungsmethode nicht zu klären. Demnach scheint der Austausch des Tyrosins die lokale Umgebung des Flavins zu verändern.

Für die YcgF-(1-137)_M23I_A90W Doppelmutante konnte eine Verringerung der Schmelztemperatur auf 38 °C beobachtet werden. Die Stabilität dieser Doppelmutante liegt demnach im Bereich vom YcgF-(1-113), einer zuvor ebenfalls spektroskopisch charakterisierten *E. coli* BLUF-Domäne ohne C-terminale J α -Helix.^[5, 6] Im Fall der Doppelmutante scheint die vorhandene J α -Helix jedoch aufgrund mutationsbedingter Störungen, der zwischen ihr und der *E. coli* YcgF-(1-137)_M23I_A90W BLUF-Domäne vorliegenden Wechselwirkungen, keinen stabilisierenden Effekt mehr zu besitzen.

Zur Analyse mutationsbedingter Veränderungen in der asymmetrischen Umgebung der aromatischen Aminosäureseitenketten wurden von den verschiedenen lichtadaptierten *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domänen CD-Spektren der nahen UV-Region (320-240 nm) aufgenommen. Diese CD-Spektren der nahen UV-Region liefern Informationen über die charakteristische Tertiärstruktur und die Chromophorumgebung eines gefalteten Proteins.

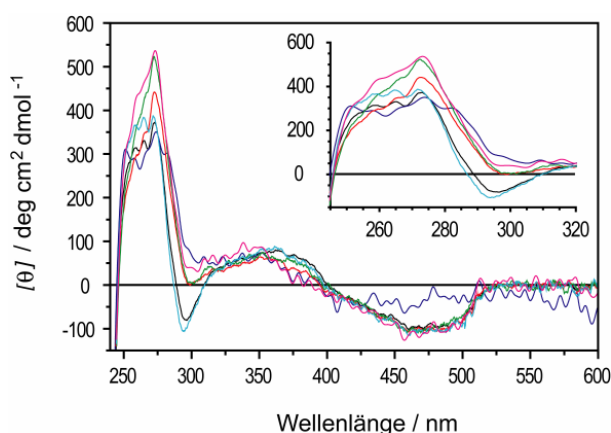


Abbildung 4.9: Nah UV und VIS CD-Spektren der verschiedenen lichtadaptierten *E. coli* YcgF(1-137) BLUF-Domänen. YcgF(1-137) (schwarz), YcgF(1-137)_Y7F (blau), YcgF(1-137)_M23I (rot), YcgF(1-137)_M23L (grün), YcgF(1-137)_A90W (hellblau) und YcgF(1-137)_M23I_A90W (pink). Die mit FMN rekonstituierten BLUF-Domänen waren in 20 mM Tris/HCl, 200 mM NaCl, pH 8.0 gelöst, die Spektren wurden bei 20 °C aufgenommen und je zehn Spektren akkumuliert.

Wie in Abb. 4.9 sichtbar zeigt das CD-Spektrum des *E. coli* YcgF-(1-137)_WT eine Phenylalanin-Feinstruktur im Bereich von 255 nm und 270 nm und der asymmetrischen Tyrosinumgebung entsprechend ein Maximum bei 275 nm. Ähnliche Spektren konnten ebenfalls für die Y7F und die A90W *E. coli* BLUF-Domänenmutanten beobachtet werden. Im

Gegensatz dazu konnte für alle Methionin 23 Mutanten der *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domäne eine weniger stark ausgeprägte Phenylalanin-Feinstruktur und eine Erhöhung des Tyrosinmaximums verzeichnet werden. Demnach beeinflusst der Austausch des Methionin 23 das asymmetrische Verhalten der Tertiärstruktur in der Umgebung von mindestens einem benachbarten Phenylalanin- und Tyrosinrest. Zu diesem veränderten asymmetrischen Verhalten kann die Verfestigung der Proteinstruktur, Freilegung eines zuvor gekoppelten Signals, Veränderung des H-Brückennetzwerks, Entfernung benachbarter polarer Gruppen und somit auch eine verändert vorliegende Polarisierbarkeit führen.^[160]

Ebenso konnte anhand der CD-Spektren beider *E. coli* A90W YcgF-(1-137) BLUF-Domänenmutanten im Bereich von 290 bis 305 nm gezeigt werden, dass sich der eingefügte Tryptophanrest 90 im lichtadaptierten Zustand nicht in einer asymmetrischen Umgebung befindet. Demnach scheinen dieser Tryptophanrest 90 und möglicherweise auch das native Alanin 90 nach Belichtung teilweise vom Lösungsmittel umgeben zu sein.

Durch Aufnahme von CD-Spektren im sichtbaren Bereich können Aussagen über die Chromophorbindung bzw. über den Redoxzustand des Flavins gemacht werden. Flavine in einer chiralen Bindungsstelle weisen, im Gegensatz zu freien ungebundenen Flavinen, einen deutlich erkennbaren Circular dichroismus auf.

Für die lichtadaptierten Zustände des Wildtyps und der M23I, M23L, A90W und M23I_A90W Mutanten der *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domäne konnte in den CD-Spektren des sichtbaren Bereichs ein Circular dichroismus bei 470 und 360 nm beobachtet werden (Abb. 4.9). Diese CD-Spektren der *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domänen weisen einen Wechsel des Circular dichroismus von positiv (300 - 400 nm) nach negativ (400 - 510 nm) auf.

Das sichtbare CD-Spektrum der YcgF-(1-137)_Y7F BLUF-Domäne zeigt aufgrund der anteiligen neutralen semichinoiden FMN Form einen nahezu vollständigen Verlust des negativen Circular dichroismus bei 400 - 510 nm. Es konnte jedoch für diese Mutante ebenso wie für die voran beschriebenen YcgF-(1-137) BLUF-Domänen ein positives Maximum bei 360 nm beobachtet werden.

4.1.3. Untersuchung des photochemischen Verhaltens der Mutanten der *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domäne

Licht- und Dunkelspektren wurden aufgenommen, um zu überprüfen, ob die Mutanten der *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domäne in der Lage sind wie der native bakterielle Photorezeptor den Photozyklus zu durchlaufen. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob sich die Wellenlänge der photometrisch bestimmten Absorptionsmaxima und die blaulichtinduzierte Rotverschiebung der YcgF-(1-137) BLUF-Domäne verändern.

Die UV/VIS-Spektren der dunkeladaptierten *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domänen (mind. 3 h Inkubation im Dunkeln) zeigen die für die oxidierte FMN Form typischen Absorptionsmaxima bei 383 nm und im Bereich von 455 bis 461 nm. Hierbei ist das zweite Maximum des Wildtyps bei 461 nm um 6 nm (Y7F, M23I, M23L und M23I_A90W Mutanten) bzw. 2 nm (A90W-Mutante) blauverschoben (Abb. 4.10, Tab. 4.4). Für YcgF-(1-137)_Y7F wurden wie erwartet neben den Absorptionsmaxima der oxidierten FMN Form auch zwei der neutralen semichinoiden Form entsprechenden Maxima bei 582 und 656 nm detektiert. Dieses Resultat korreliert mit der Grünfärbung und den CD-spektroskopischen Daten des sichtbaren Bereichs. Nach einminütiger Lichtbestrahlung konnte wie zuvor für das *E. coli* YcgF-(1-137) auch für die M23I, M23L, A90W und M23I_A90W Mutanten eine Rotverschiebung des Absorptionsmaximums bei 455 bis 461 nm um 3 bis 6 nm beobachtet werden. Die durch Lichtbestrahlung erhaltenen Absorptionsspektren der *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domänenmutanten weisen, wie zuvor im Dunkelzustand beobachtet, eine Blauverschiebung des Absorptionsmaximums bei 459 bis 462 nm auf.

BLUF- Domäne	Dunkelzustand	Lichtzustand	Rotverschiebung
YcgF-(1-137)_Y7F	380 nm / 455 nm	380 nm / 455 nm	0 nm
YcgF-(1-137)_M23I	382 nm / 455 nm	383 nm / 459 nm	4 nm
YcgF-(1-137)_M23L	383 nm / 455 nm	385 nm / 461 nm	6 nm
YcgF-(1-137)_A90W	383 nm / 459 nm	382 nm / 462 nm	3 nm
YcgF-(1-137)_M23I_A90W	382 nm / 455 nm	382 nm / 460 nm	5 nm
YcgF-(1-137)_WT	385 nm / 461 nm	385 nm / 465 nm	4 nm

Tabelle 4.4: Absorptionsmaxima des dunkel- bzw. lichtadaptierten Zustandes und Rotverschiebung der verschiedenen mit FMN rekonstituierten *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domänen.

Die Y7F-Mutante hingegen schien zwischen dem dunkeladaptiertem Zustand und der Ausbildung einer radikalischen Spezies festzuhängen und zeigte nicht die für BLUF-Domänen charakteristische blaulichtinduzierte Rotverschiebung (Abb. 4.10, Tab. 4.4).

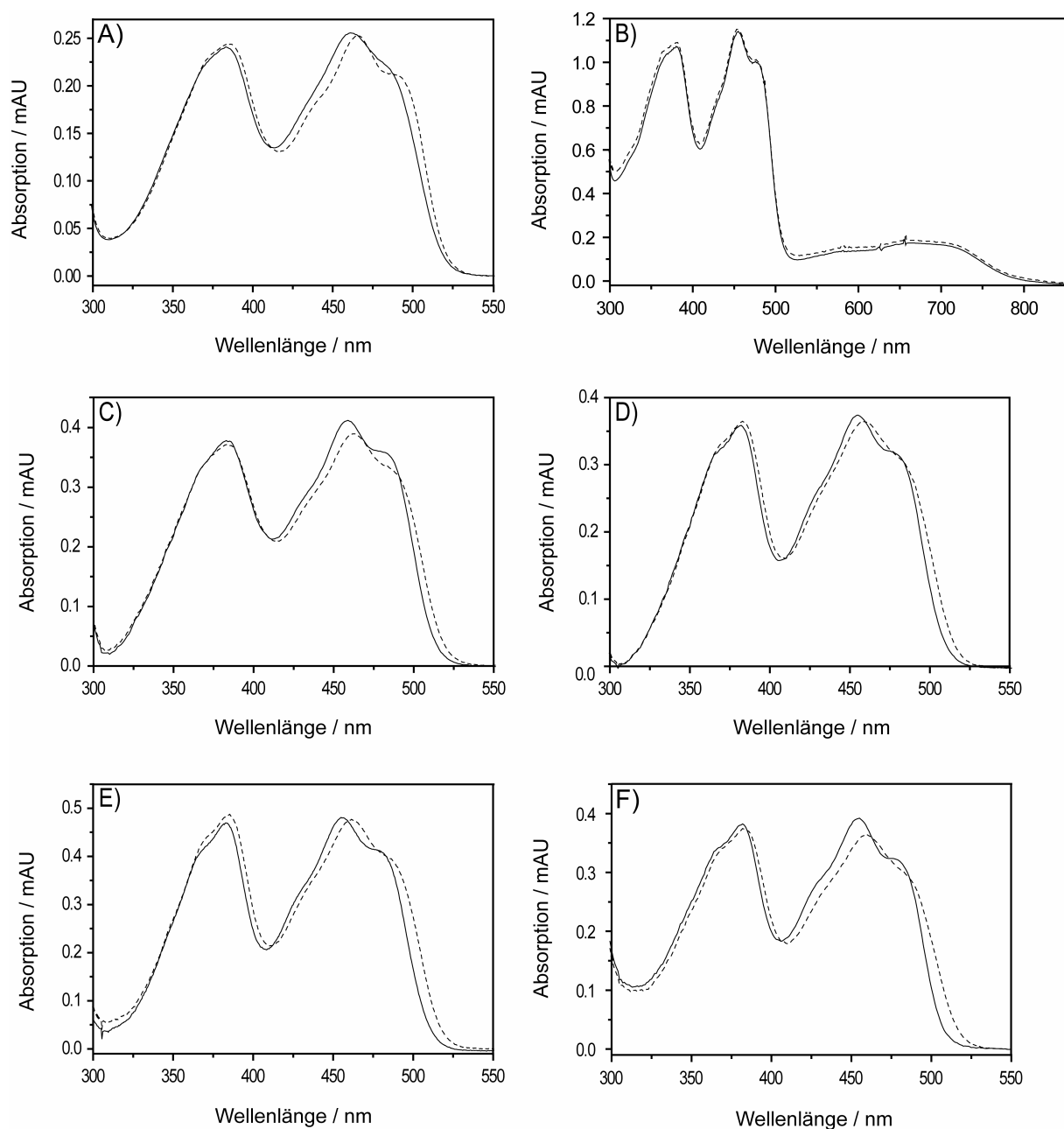


Abbildung 4.10: UV/VIS Absorptionsspektren der dunkel- (—) und lichtadaptierten (---) YcgF-(1-137) BLUF-Domänen. A) YcgF-(1-137) (16 μ M), B) YcgF-(1-137)_Y7F (95 μ M), C) YcgF-(1-137)_M23I (30 μ M), D) YcgF-(1-137)_M23L (30 μ M), E) YcgF-(1-137)_A90W (36 μ M), F) YcgF-(1-137)_M23I_A90W (30 μ M). Die lichtadaptierten YcgF-(1-137) BLUF-Domänen wurden unter einminütiger Bestrahlung in max. 5 cm Abstand mit der Weißlicht-LED-Lampe Liberty (Conrad) hergestellt. Die mit FMN rekonstituierten BLUF-Domänen waren in 20 mM Tris/HCl, 200 mM NaCl, pH 8.0 gelöst und die Spektren wurden bei 15 °C aufgenommen.

Zwischen den dunkel- und lichtadaptiertem UV/VIS-Spektren der *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domänenmutanten M23I, M23L, A90W und M23I_A90W traten wie beim Wildtyp fünf isosbestische Punkte auf (Tab. 4.5). Hierbei konnte im Vergleich zum Wildtyp bei allen Einzelmutanten eine Blauverschiebung des ersten um 11 nm bis 17 nm und zusätzlich für die Methioninmutanten des dritten und fünften isobestischen Punktes um ca. 5 nm beobachtet werden. Die M23I_A90W Doppelmutante weist hingegen einen um 8 nm rotverschobenen ersten und um 5 nm blauverschobenen zweiten isosbestischen Punkt auf. Da in der Doppelmutante für den dritten und fünften isosbestischen Punkt nicht die für die M23I-Mutante beobachtete Blauverschiebung detektiert werden konnte, scheint die A90W Mutation die veränderten Eigenschaften der M23I Mutation auszugleichen.

BLUF- Domäne	Isosbestische Punkte / nm
YcgF-(1-137)_Y7F	-
YcgF-(1-137)_M23I	365, 410, 460, 477, 483
YcgF-(1-137)_M23L	360, 412, 459, 478, 483
YcgF-(1-137)_A90W	359, 409, 467, 473, 491
YcgF-(1-137)_M23I_A90W	384, 406, 463, 474, 487
YcgF-(1-137)_WT	376, 411, 465, 474, 488

Tabelle 4.5: Isosbestische Punkte der mit FMN rekonstituierten YcgF-(1-137) BLUF-Domänen.

Die Licht- minus Dunkel-Differenzspektren der untersuchten photoaktiven *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domänen ähneln sich stark (Abb. 4.11 und Anhang 6.3). Hierbei weisen alle Methionin 23 Mutanten eine stärkere Ausprägung des Minimums bei 424 bis 428 nm im Vergleich zur nativen BLUF-Domäne auf. Neben diesen Trend konnte für die M23I, M23L und die M23I_A90W noch eine Erhöhung der Maxima bei 390 und 470 nm und für die A90W-Mutante eine Verringerung aller Extrema beobachtet werden. Somit verdeutlichen, neben den blauverschobenen Absorptionsmaxima bei 455 bis 462 nm, die Licht- minus Dunkel-Differenzspektren die veränderten photochemischen Eigenschaften der verschiedenen *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domänenmutanten. Dies zeigt, dass die ausgetauschten Tyrosin- 7, Methionin- 23 und Alaninreste 90 an den photochemischen Prozessen der *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domäne teilhaben bzw. diese beeinflussen.

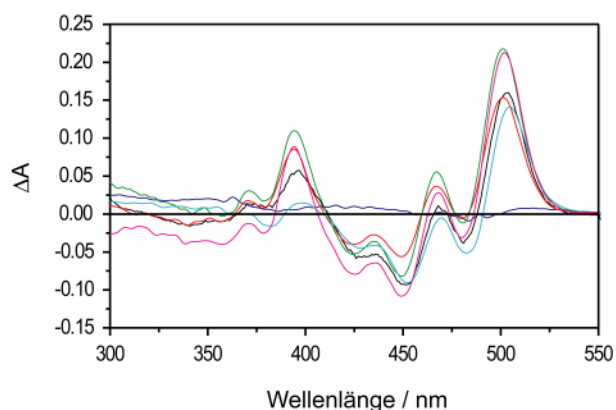


Abbildung 4.11: Differenzspektren der verschiedenen *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domänen. YcgF-(1-137) (schwarz), YcgF-(1-137)_Y7F (blau), YcgF-(1-137)_M23I (rot), YcgF-(1-137)_M23L (grün), YcgF-(1-137)_A90W (hellblau) und YcgF-(1-137)_M23I_A90W (pink).

4.1.4. Analyse der Dunkelreversion der Mutanten der *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domäne

Halbwertszeiten der Licht-Dunkel-Konversion wurden bei 19 °C und 503 nm aufgenommen, um die Stabilität des lichtadaptierten Zustandes zu analysieren. Hierbei sollte überprüft werden, ob der lichtadaptierte Zustand der *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domänenmutanten ähnlich stabilisiert ist wie der des Wildtyps oder ob eine Beschleunigung der Zerfallsraten zu beobachten ist.

BLUF- Domäne	Halbwertszeit der Licht-Dunkel-Konversion
YcgF-(1-137)_M23I	4 min 19 s ± 27 s
YcgF-(1-137)_M23L	5 min 57 s ± 13 s
YcgF-(1-137)_A90W	3 min 6 s ± 16 s
YcgF-(1-137)_M23I_A90W	8 s ± 1 s
YcgF-(1-137)_WT	14 min 42 s ± 4 min 48 s

Tabelle 4.6: Halbwertszeiten der verschiedenen mit FMN rekonstituierten *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domänen. Die BLUF-Domänen waren in 20 mM Tris/HCl, 200 mM NaCl, pH 8.0 gelöst und die Halbwertszeiten wurden bei 19 °C gemessen.

Die verschiedenen Halbwertszeiten sind in Tabelle 4.6 aufgeführt und wurden mit einer monoexponentiellen Zerfallsfunktion gefittet. Beim Vergleich der ermittelten Halbwertszeiten

untereinander konnte eine Abnahme dieser in Abhängigkeit von der Anzahl, Position und Art der Mutation festgestellt werden. So verringerten sich, bezogen auf das native *E. coli* YcgF-(1-137) ($t_{1/2} = 14 \text{ min } 42 \text{ s}$), die Halbwertszeiten der Einzelmutanten M23L, M23I und A90W auf 40.5 %, 29.4 % und 21.1 % und der M23I_A90W Doppelmutante auf 0.9 %. Der lichtadaptierte Zustand der YcgF-(1-137)_M23I_A90W Mutante ist demnach stark destabilisiert und zerfällt mit einer Halbwertszeit von 8 s. Demnach scheinen sowohl das Methionin 23 als auch das Alanin 90 im Wildtyp der *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domäne einen relativ großen Anteil an der Stabilisierung des lichtadaptierten Zustandes bei 19 °C bzw. ihres Photozyklus zu besitzen.

Da die Licht-Dunkelkonversion der nativen *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domäne temperaturabhängig ist,^[45] wurden zur Überprüfung dieses Effektes von ihren M23I, M23L, A90W und M23I_A90W Mutanten, die Halbwertszeiten der Dunkelkonversion zwischen 24 °C und 7 °C bzw. 3 °C bestimmt. Für die YcgF-(1-137) BLUF-Domänenmutanten konnte wie zuvor für den Wildtyp bei Temperaturverringern eine beträchtliche Verlangsamung der Dunkelkonversion beobachtet werden (Anhang 6.4).

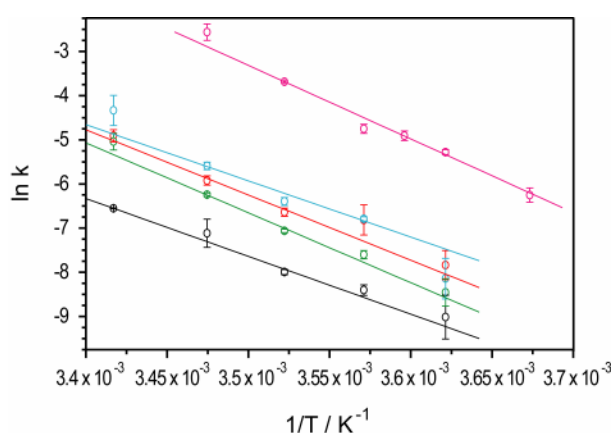


Abbildung 4.12: Arrheniusplots mit Fehlerbalken der Dunkelreversion der verschiedenen mit FMN rekonstituierten *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domänen. YcgF-(1-137) (schwarz), YcgF-(1-137)_Y7F (blau), YcgF-(1-137)_M23I (rot), YcgF-(1-137)_M23L (grün), YcgF-(1-137)_A90W (hellblau) und YcgF-(1-137)_M23I_A90W (pink). Die UV/VIS Kinetiken wurden bei 503 nm in 20 mM Tris/HCl, 200 mM NaCl, pH 8.0 aufgenommen. Jede Halbwertszeit wurde mindestens dreimal gemessen und gemittelt.

Zur Ermittlung der Aktivierungsenergien der *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domänenmutanten wurde der Logarithmus der Geschwindigkeitskonstanten gegen die inverse Temperatur aufgetragen (Abb. 4.12, Tab. 4.7). Der für YcgF-(1-137)_A90W erhaltene Wert von

106 kJ/mol ist ähnlich zu der mit 109 kJ/mol ermittelten Aktivierungsenergie der nativen *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domäne. Im Gegensatz zur A90W-Mutante weisen sowohl die M23I und die M23L Einzelmutanten als auch die M23I_A90W Doppelmutante höhere Aktivierungsenergien von 123, 132 bzw. 139 kJ/mol auf. Im Gegensatz zur A90W Einzelmuation scheinen die anstelle des Methionin 23 eingefügten Isoleucin- und Leucinreste entweder einen Einfluss auf die während der Dunkelreversion durchlaufenden komplexen strukturellen Änderungen zu besitzen oder an diesen teilzuhaben. Weiter deutet die ebenfalls erhöhte Aktivierungsenergie der Doppelmutante eine durch das Einfügen des Isoleucin 23 bedingte Beteiligung des Tryptophanrest an den sterischen Veränderungen an, die während der Dunkelreversion ablaufen.

BLUF-Domäne	Aktivierungsenergie
YcgF-(1-137)_M23I	122.8 kJ/mol \pm 10.5 kJ/mol
YcgF-(1-137)_M23L	131.6 kJ/mol \pm 6.4 kJ/mol
YcgF-(1-137)_A90W	105.8 kJ/mol \pm 7.7 kJ/mol
YcgF-(1-137)_M23I_A90W	138.5 kJ/mol \pm 4.1 kJ/mol
YcgF-(1-137)_WT	108.8 kJ/mol \pm 3.7 kJ/mol

Tabelle 4.7: Aktivierungsenergien der verschiedenen mit FMN rekonstituierten *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domänen. Die BLUF-Domänen waren in 20 mM Tris/HCl, 200 mM NaCl gelöst.

4.1.5. Untersuchung des Triplettzustandes der Mutanten der *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domäne

Die tr-EPR spektroskopischen Untersuchungen wurden durchgeführt, um herauszufinden ob die *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domänenmutanten einen Flavintriplettzustand aufweisen und ob sich dieser im Vergleich zum nativen BLUF-Photorezeptor verändert.

Die tr-EPR Spektren der verschiedenen *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domänen wurden bei 80 K von Dr. Erik Schleicher (AK Weber, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg) aufgenommen. Im Gegensatz zu konventioneller EPR Spektroskopie sind tr-EPR-Spektren unabgeleitete Funktionen, bei denen positive und negative Signale eine erhöhte absorbierende und emittierende Elektronenspinpolarisation der EPR Übergänge bedeuten.

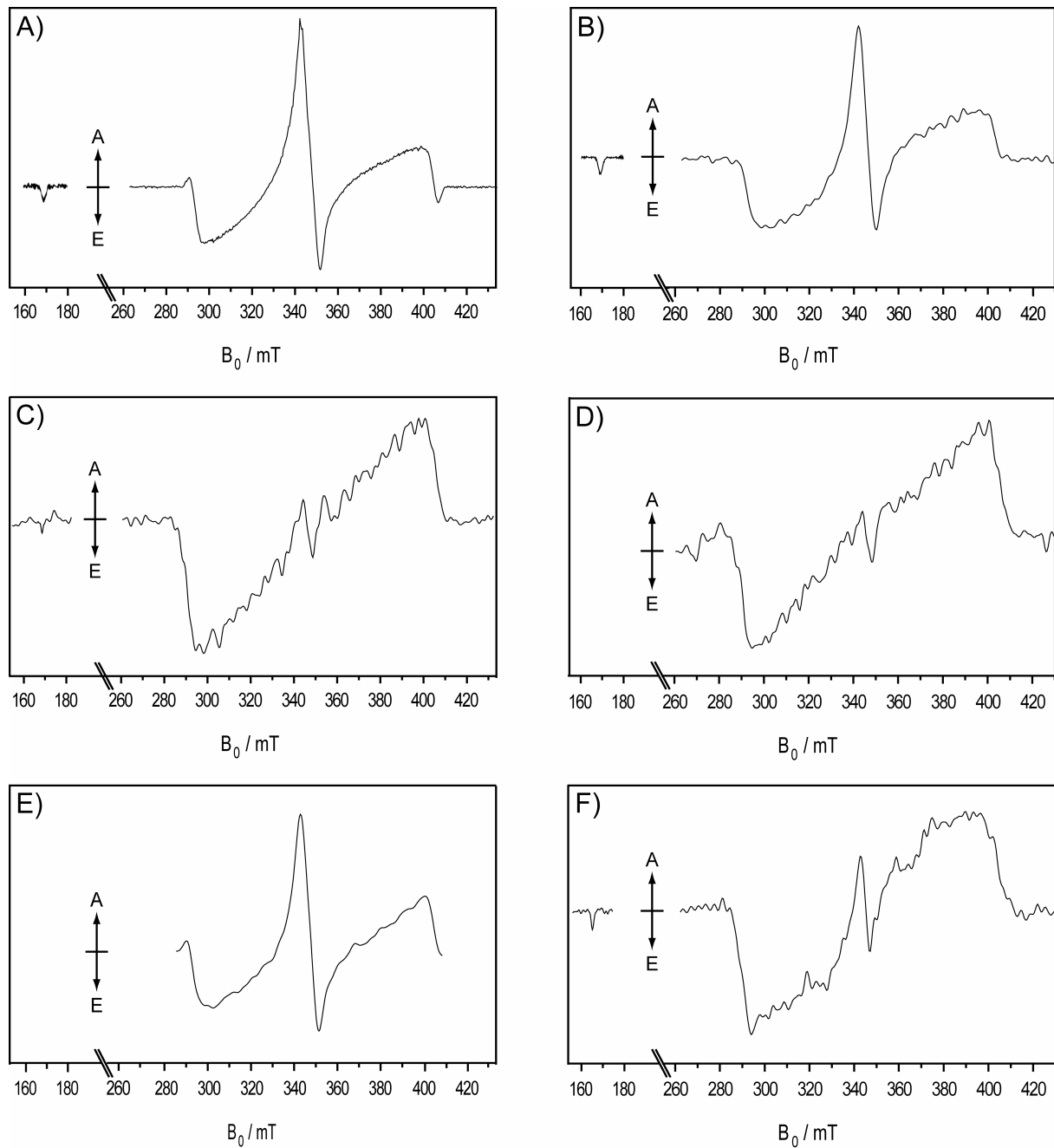


Abbildung 4.13: Tr-EPR Spektren der verschiedenen mit FMN rekonstituierten *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domänen. A) YcgF-(1-137), B) YcgF-(1-137)_Y7F, C) YcgF (1 137)_M23I, D) YcgF-(1-137)_M23L, E) YcgF-(1-137)_A90W, F) YcgF (1 137)_M23I_A90W. Die tr-EPR Spektren wurden 1 μ s nach Anregung durch einen gepulsten Laser aufgenommen. Der Halbfeldübergang wurde nur bei einigen Mutanten zur Überprüfung des vorhandenen Triplettzustandes aufgenommen.

Für die native *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domäne und ihre Y7F, M23I und M23I_A90W Mutanten wurde überprüft, ob von den bakteriellen Photorezeptoren tatsächlich ein Triplettzustand des FMN ausgebildet wurde. Die Existenz des Flavintriplettzustandes konnte anhand eines schwachen Signals bei 169 mT (entsprechend $g \approx 4$), den Spinverbotenen

Halbfeldübergang repräsentierend ($\Delta M_S = \pm 2$ Resonanzen), verifiziert werden (Abb. 4.13).
[161, 162]

Die Profile der erhaltenen EPR-Spektren zeigen sowohl für die native, dunkeladaptierte *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domäne als auch für ihre dunkeladaptierten Mutanten die charakteristischen Positionen der Extrema, Wendepunkte und übergreifenden Polarisierungseigenschaften des durch *Intersystem Crossing* (ISC) generierten FMN Triplettzustandes.^[155] Alle tr-EPR-Spektren der untersuchten *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domänen besitzen ein Hauptsignal ($\Delta M_S = \pm 1$), welches bei 345 mT ($g \approx 2$) zentriert ist. Dieses Signal verläuft über einen Bereich von 130 mT mit der emittierenden Elektronenspinpolarisation unterhalb und einer verstärkten absorbierenden Elektronenspinpolarisation oberhalb von $g \approx 2$ (Abb. 4.13). Tr-EPR Spektren, die mit lichtadaptierten Proben gemessen wurden, zeigten keinerlei Signal.

Das Triplett-Spektrum des FMN für die native *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domäne ist relativ komplex aufgebaut und repräsentiert einige Charakteristika: Zu diesen gehören zwei kleinere Peaks bei 297 und 399 mT und ein stark polarisiertes Signal zwischen 340 und 355 mT. Um diese Charakteristika zu verstehen, wurden die Y7F, M23I, M23L und A90W Einzelmутanten, sowie die M23I_A90W Doppelmutante unter identischen experimentellen Bedingungen vermessen. Eine erste, sehr qualitative Betrachtung der Spektren in Abb. 4.13 zeigt deutlich Unterschiede zwischen dem Wildtyp und den YcgF-Mutanten, die sich in zwei Gruppen unterteilen lassen. Zum einen zeigen die Y7F und die A90W Probe zunächst ein sehr ähnliches Bandenmuster und damit vergleichbare Triplett-Parameter im Vergleich zum Wildtyp. In ersten Simulationen jedoch konnten definierte Unterschiede festgestellt werden, die in der nativen *E. coli* BLUF-Domäne auf einen geringen Einfluss des Tyrosinrest 7 und in beiden A90W-Mutanten auf eine Interaktion des eingefügten Tryptophans mit dem FMN hindeuten (Erik Schleicher, persönliche Kommunikation). Zum anderen zeigen im Gegensatz zum Wildtyp YcgF-(1-37) sowohl die M23I und M23L Einzelmутanten als auch die M23I_A90W Doppelmutante ein deutlich verändertes Spektrum. Trotz insgesamt schlechterem Signal/Rauschen, welches durch eine geringere Probenkonzentration erklärt werden kann, können die Veränderungen klar detektiert werden. Das intensive stark polarisierte A/E Signal zwischen 340 und 355 mT ist im Fall der beiden M23I und M23L Mutanten verschwunden, bzw. für die M23I_A90W Doppelmutante deutlich reduziert. Die erhaltenen tr-EPR-Spektren der Methioninmutanten verlieren daher an ihrer Komplexität und weisen ein ähnlich einfaches Profil, wie der Triplettzustand einer FMN-Lösung auf.^[155] Folglich scheint der Methioninrest 23 in der nativen *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domäne im

Triplettzustand aufgrund seiner Nähe mit dem FMN Isoalloxazinring zu interagieren und so die inneren asymmetrischen Peaks im tr-EPR-Signal der nativen *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domäne zu bewirken.

4.2. Konversion der Bindungs- und Reparatoreigenschaften der *A. thaliana* (6-4)-DNA-Photolyase

Die pflanzliche *Arabidopsis thaliana* (6-4)-DNA-Photolyase (537 AS, Molekulargewicht 61.6 kDa, Swiss-Prot Eintrag O48652) besitzt wie alle Mitglieder dieser Photolyaseklasse, eine N-terminale Photolyasedomäne (S5-S183) und eine C-terminale FAD-Bindungsdomäne (G220-Y497) mit einer für den (6-4)-Schaden spezifischen Substratbindungstasche.

Neben dem aktiven Zentrum, der Kofaktorumgebung und dem Tryptophan-Elektronen-Transfer-Weg weist die *A. thaliana* (6-4)-Photolyase eine Phosphatbindungsstelle (D235-A256), ein überstehendes PLK Motiv (Y282-L300), welches den Zugang zur Substratbindungsstelle über dem FAD einschränkt, einen Schwefel-Loop (M318-C324) und eine den Cryptochromen ähnliche C-terminale α -Helix (D508-D522) auf.^[85]

At6-4PHR Mutante	Richtung der Mutation	Ziel der Mutation
K246R	→ AnPHR → AtCry3	Interaktion mit 5' Thymin des CPD-Schadens
Q298E	→ AnPHR → AtCry3	Wasserstoffbrückenbindung zum 5' Thymin des CPD-Schadens
H364N_L365R	→ AnPHR → AtCry3	Wasserstoffbrückenbindung zum 3' Thymin des CPD-Schadens Interaktion mit +1 Phosphatrest
H368M	→ AnPHR	Interaktion mit 3' Thymin des CPD-Schadens
H368Q	→ AtCry3	Interaktion mit 3' Thymin des CPD-Schadens
H364N_L365R_H368M	→ AnPHR	siehe entsprechende Einzel- und Doppelmutanten
H364N_L365R_H368Q	→ AtCry3	siehe entsprechende Einzel- und Doppelmutanten
W408Y	→ AtCry3	Aliphatische Wechselwirkungen zum CPD-Schaden
F427Q	→ AnPHR → AtCry3	Interaktion mit +1 und +2 Phosphatrest

Tabelle 4.8: Generierte Mutanten der *A. thaliana* (6-4)-DNA-Photolyase. At6-4PHR: *A. thaliana* (6-4)-Photolyase, AnPHR: *A. nidulans* CPD-Photolyase, AtCry3: *A. thaliana* DASH Cryptochrom 3.

(6-4)- und CPD-DNA-Photolyasen weisen eine hohe Spezifität für den jeweiligen DNA-Schaden auf. Die *A. thaliana* (6-4)-DNA-Photolyase soll in den CPD-Schäden erkennenden und reparierenden Subtyp konvertiert werden. Zu diesem Zweck sollen die an der Reparatur des (6-4)-Schadens beteiligten hochkonservierten Aminosäurereste gegen in CPD-Photolyasen und DASH Cryptochromen an der DNA-Bindung und Reparatur beteiligte Aminosäuren ausgetauscht werden. Die folgenden in Tabelle 4.8 aufgeführten Oberflächenmutanten wurden anhand der Kristallstrukturen der *A. nidulans* CPD-Photolyase (pdb ID: 1TEZ) und des *A. thaliana* DASH Cryptochrom 3 (pdb ID: 2VTB) mit CPD geschädigter DNA und ausgewählt. Die Herstellung und Analyse der *A. thaliana* (6-4)-DNA-Photolyasemutanten soll eventuelle Effekte der an der Reparatur des (6-4)-Schadens beteiligten hochkonservierten Aminosäurereste auf die Photoaktivierungseigenschaften und die Substratspezifität der *A. thaliana* (6-4)-Photolyase aufzeigen (Abb. 4.14).

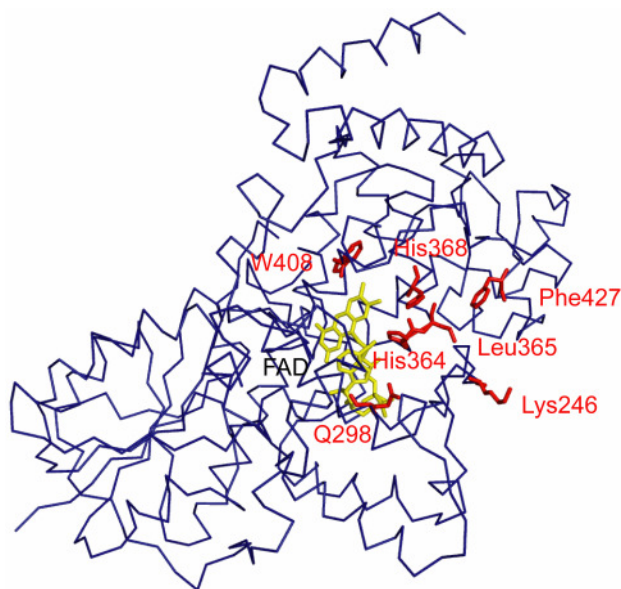


Abbildung 4.14: Bänderdarstellung der *A. thaliana* (6-4)-DNA Photolyase (PDB ID: 3fy4B). Dargestellt sind die ausgetauschten nativen Aminosäurereste (rot) und der katalytische FAD-Kofaktor (gelb) des (6-4)-Enzyms.

4.2.1. Expression und Aufreinigung der nativen *A. thaliana* (6-4)-Photolyase und ihrer verschiedenen Mutanten

Das Plasmid pET28-AraPL wurde mittels PCR aus dem Templat AraPL-pGEX4T-2 (bereitgestellt von AK Prof. Batschauer, Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg) mit den unter Abschnitt 2.5.1.1 in Tabelle 2.3 aufgelisteten Primern amplifiziert. Anschließend wurde das mit den Restriktionsenzymen *AseI* und *SacI* verdaute PCR-Amplifikat mit dem pET28a Vektor ligiert. Das resultierende Plasmid wurde durch analytischen Verdau mit *NcoI* und durch DNA-Sequenzanalyse geprüft.

Alle Oberflächenmutanten der *A. thaliana* (6-4)-DNA-Photolyase wurden durch Mutagenese unter Verwendung von in Abschnitt 3.1.3 beschriebenen Standardprotokollen mit der Pfu-Turbo und der Phusion Polymerase hergestellt. Die Mutagenese wurde mit dem Templat pET28-AraPL und den unter Abschnitt 2.5.1.1 in Tabelle 2.4 aufgelisteten Primern durchgeführt. Die erhaltenen Mutanten der *A. thaliana* (6-4)-DNA-Photolyase wurden durch analytische Restriktionsverdau, wenn möglich unter Verwendung der eingefügten Restriktionsschnittstellen, mit *DraIII* (K246R), *AvaI* (Q298E), *BssHII* (H364N_L365R, H364N_L365R_H368M und H364N_L365R_H368Q) und *NcoI* (H368M, H368Q, W408Y und F427Q) sowie durch DNA-Sequenzanalyse verifiziert.

Die rekombinante Produktion der *A. thaliana* (6-4)-DNA-Photolyase und ihrer Mutanten erfolgte unter den Bedingungen der Autoinduktion. Die Expression erfolgte bei 30 °C in 6 L TB-Medium und als Bakterienstamm wurde *E. coli* BL21-Gold (DE3) oder Rosetta (DE3) verwendet. Nach einer Expressionszeit von 24 h wurden die Zellen geerntet, in Puffer B mit 500 mM NaCl resuspendiert und bis zum Zellaufschluss bei -80 °C gelagert. Dreimaliges Aufschließen der Zellen mit dem Emulsifier (*Avestin*) lieferte sowohl von der *A. thaliana* (6-4)-Photolyase als auch von ihren Mutanten zwischen 20 und 35 % lösliches Protein. Die filtrierten *A. thaliana* (6-4)-Photolyaselösungen wurden über eine 7 mL Ni-NTA Säule aufgereinigt. Im Verlauf eines Gradienten über 12.5 Säulenvolumina von 0 auf 250 mM Imidazol konnten die aufgereinigte (6-4)-Photolyase und ihre Mutanten bei einer Imidazolkonzentration von ~ 70 mM von der Säule eluiert werden. Die zu diesem Zeitpunkt noch grün gefärbten Proteinfraktionen wurden nach der Kontrolle mittels eines 12 % SDS-PAGE Gels vereinigt und durch Ultrafiltration auf einem Konzentrator mit einem Ausschlussvolumen von 50 kDa ankonzentriert. Im Gegensatz zum Wildtyp der *A. thaliana* (6-4)-Photolyase wurden die Mutanten in Gegenwart von 10 bis 15 % Glycerin ankonzentriert, um so eine eventuelle Aggregation der Enzyme zu verhindern. Trotz Zugabe von Glycerin verlor die Q298E Mutante der *A. thaliana* (6-4)-Photolyase ihren katalytischen FAD-Kofaktor und aggregierte im Verlauf dieses Konzentrationsschrittes, so dass sie nicht weiter aufgereinigt werden konnte.

Während der im Anschluss durchgeführten Größenausschlusschromatographie wurde die native *A. thaliana* (6-4)-Photolyase in den Tris-haltigen Puffer F umgepuffert. Für die Photolyasemutanten wurde die Größenausschlusschromatographie in phosphathaltigem Puffer B durchgeführt. Als Säule wurde eine Superdex 200 10/300 für die Größenausschlusschromatographie verwendet. Die aufgereinigten *A. thaliana*

(6-4)-Photolyasen wurden alle nach ca. 13.5 mL mit einem dem Monomer entsprechenden apparenten Molekulargewicht von ~ 67 kDa von der Säule eluiert (Abb. 4.15). Demnach bewirkt der Austausch dieser in allen (6-4)-Photolyasen konservierten Aminosäurereste keine Veränderung des oligomeren Zustands der *A. thaliana* (6-4)-Photolyase durch zusätzliche Protein-Protein-Interaktionen.

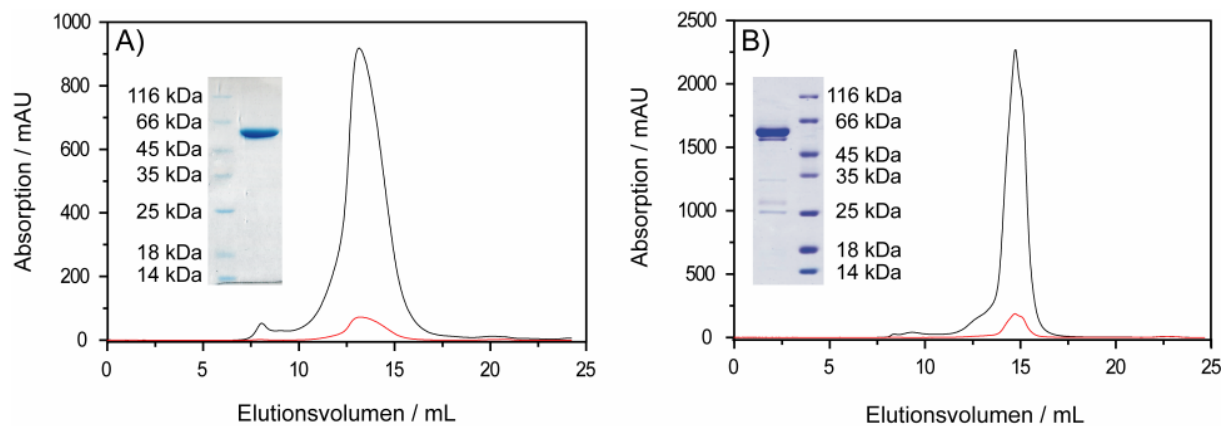


Abbildung 4.15: Elutionsprofile der Größenausschlusschromatographie zweier *A. thaliana* (6-4)-DNA-Photolyasen. Für die Chromatographie wurde eine Superdex 200 10/300 Säule verwendet. Die Elution wurde bei 280 nm (schwarz) und 450 nm (rot) detektiert. A) Der aufgetragene *A. thaliana* (6-4)-Photolyase Wildtyp wurde bei einem R_f von 0.60 CV und einem OD_{445}/OD_{280} Quotienten von 0.076 und B) die W408Y Mutante mit einem R_f von 0.61 CV und einem OD_{445}/OD_{280} Quotienten von 0.082 von der Säule eluiert. Eingebettet sind die 12 % SDS-PAGE Gele beider aufgereinigter *A. thaliana* (6-4)-Photolyasen zu sehen.

Die gelb gefärbten, im oxidierten Zustand vorliegenden *A. thaliana* (6-4)-DNA-Photolyasen konnten sauber und in ausreichenden Mengen von ~ 6 mg/L Kultur aufgereinigt werden (Abb. 4.15, Tab. 4.9). Zur Ermittlung der quantitativen Besetzung des katalytischen Kofaktors wurden zunächst anhand des Elutionsprofils der Größenausschlusschromatographie der $OD_{450/280}$ Quotient der nativen *A. thaliana* (6-4)-Photolyase und anschließend ihr Protein/Kofaktor Verhältnis bestimmt. Hierbei wurde ein $OD_{450/280}$ Quotient von 0.076 ähnlich dem Wert von 0.067 für die *D. salina* (6-4)-Photolyase ermittelt (Abschnitt 4.3.1). Zur Bestimmung des Protein/ Kofaktor Verhältnisses wurde eine bekannte Konzentration der *A. thaliana* (6-4)-Photolyase mit TCA gefällt, die Absorption des freigesetzten FAD bei 450 nm gemessen und dessen Konzentration berechnet. Das so ermittelte Verhältnis von 1:0.95 zeigt, dass der katalytische FAD Kofaktor vollständig in die (6-4)-Photolyase eingebaut wurde. Da ein Zusammenhang zwischen diesen beiden Werten besteht, wurde die Vollbesetzung der Mutanten der *A. thaliana* (6-4)-Photolyase anhand ihrer $OD_{450/280}$ Quotienten bestimmt. Die untersuchten (6-4)-Photolyasemutanten besaßen ähnliche $OD_{450/280}$

Quotienten im Bereich von 0.073 bis 0.082 und waren somit homogen mit dem katalytischem FAD Kofaktor besetzt. In den aufgereinigten *A. thaliana* (6-4)-Photolyasen stört demnach die Mutation der nativen Aminosäurereste keine der für die FAD-Bindung benötigten Wechselwirkungen.

At6-4PHR Mutante	Proteinmenge / L	OD _{450/280}
K246R	7 mg	0.082
H364N_L365R	3 mg	0.073
H368M	6 mg	0.077
H368Q	6 mg	0.076
H364N_L365R_H368M	4 mg	0.078
H364N_L365R_H368Q	5 mg	0.075
W408Y	10 mg	0.082
F427Q	9 mg	0.08
Wildtyp	6 mg	0.076

Tabelle 4.9: Aufgereinigte Proteinmenge pro Liter *E. coli* Kultur und OD_{450/280} Quotienten der verschiedenen *A. thaliana* (6-4)-DNA-Photolyasen.

4.2.2. Untersuchung der nativen Faltung und Proteinstabilität

Das Faltungsverhalten und die thermische Stabilität der *A. thaliana* (6-4)-Photolyasen wurden durch CD-spektroskopische Untersuchungen analysiert. Hierzu wurden zunächst CD-Spektren der fern-UV Region (260 bis 190 nm) aufgenommen, um die Zusammensetzung der Sekundärstrukturelemente zu ermitteln.

Das CD-Spektrum der *A. thaliana* (6-4)-Photolyase besitzt überwiegend α -helikale Charakteristika mit einem negativen Doppelmaximum bei 220 und 210 nm und weist nur einen geringen Prozentsatz von > 5 % an β -Faltblättern auf (Abb. 4.16A). Jedoch scheinen im Vergleich zur oxidierten *D. salina* (6-4)-Photolyase einige α -helikale Strukturen etwas gestört zu sein (Abschnitt 4.3.3, Abb. 4.39). Ein Vergleich aller *A. thaliana* (6-4)-Photolyasemutanten mit dem nativen Enzym zeigt keine mutationsbedingten signifikanten Unterschiede im Faltungsverhalten ihrer Sekundärstrukturelemente (Abb. 4.16B). Demnach verursacht der Austausch der jeweiligen nativen Aminosäuren keine

weitere Fehlordnung in der Faltung der α -Helices, bedingt aber auch keine weitere Stabilisierung dieser.

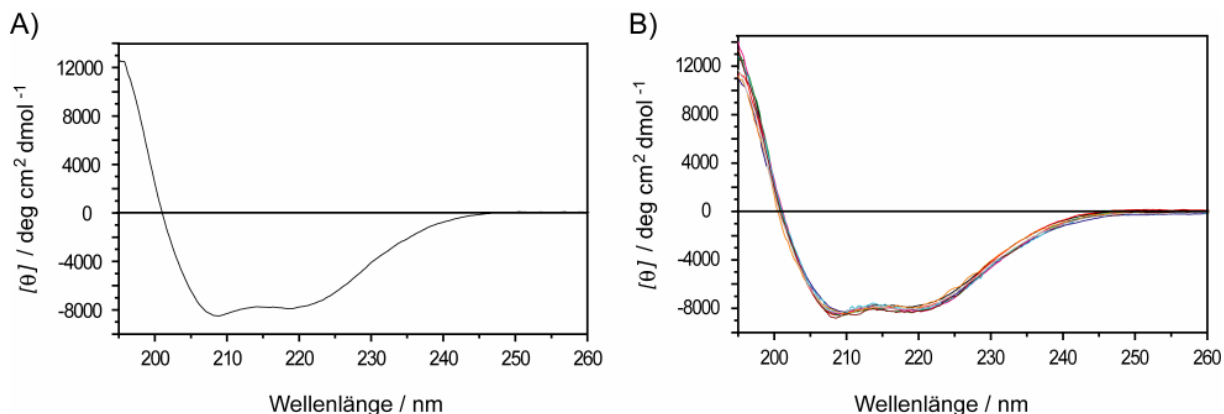


Abbildung 4.16: CD-Spektren der verschiedenen *A. thaliana* (6-4)-DNA-Photolyasen. (A) Native *A. thaliana* (6-4)-DNA-Photolyase und B) Überlagerung dieser mit den CD Spektren ihrer verschiedenen Mutanten. WT (schwarz), K246R (rot), H364N_L365R (blau), H368M (grün), H368Q (pink), H364N_L365R_H368M (türkis), H364N_L365R_H368Q (orange), W408Y (weinrot) und F427Q (grau). Die native *A. thaliana* (6-4)-Photolyase war in 2 mM Tris/HCl, 20 mM NaCl, 1 % Glycerin, pH 7.4 und ihre Mutanten waren in 5 mM Na_2HPO_4 , 200 mM NaCl, 1 % Glycerin, pH 7.4 gelöst. Die Spektren wurden bei 20 °C aufgenommen und je drei Spektren akkumuliert.

Die bei 207 nm aufgenommenen Schmelzkurven der *A. thaliana* (6-4)-Photolyase und ihrer Mutanten zeigen ein kooperatives Denaturierungsverhalten beim Erhitzen auf 95 °C. Beim langsamen Abkühlen falteten sich die (6-4)-Photolyasen erwartungsgemäß nicht wieder in ihren ursprünglichen Zustand zurück (Abb. 4.17 und 4.18).

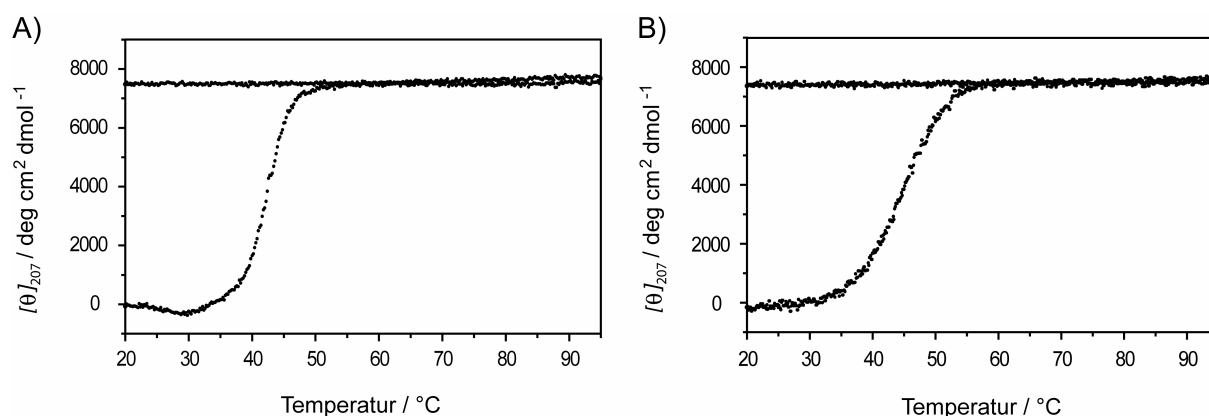


Abbildung 4.17: Schmelzkurven der A) nativen und B) H364N_L365R *A. thaliana* (6-4)-DNA-Photolyasen. Die native *A. thaliana* (6-4)-Photolyase war in 2 mM Tris/HCl, 20 mM NaCl, 1 % Glycerin, pH 7.4 und ihre Mutante in 5 mM Na_2HPO_4 , 200 mM NaCl, 1 % Glycerin, pH 7.4 gelöst. Die Schmelzkurven wurden bei 207 nm von 20 °C bis 95 °C mit 2 °C/ min aufgenommen.

Eine Überlagerung der Schmelzkurven zeigt, dass die Schmelztemperaturen der verschiedenen *A. thaliana* (6-4)-DNA-Photolyasen nur geringe thermische Stabilitätsunterschiede im Bereich von $\sim 7^\circ\text{C}$ aufweisen. Wie in Abb. 4.18 sichtbar, denaturiert die native (6-4)-Photolyase bei 43°C , während die eingefügten Aminosäuren die H364N_L365R, H368Q, H368M und F427Q Mutanten etwas stabilisieren, so dass sich diese erst bei 46°C entfalten. In den beiden Dreifachmutanten scheinen die mutationsbedingten Veränderungen so groß zu sein, dass sie einen negativen Einfluss auf die Stabilität der Faltung der Sekundärstrukturelemente besitzen und die (6-4)-Photolyasen schon bei 38°C denaturieren. Somit scheint in den Histidinmutanten die Entfernung eines Histidins aus der His364-His368-Tyr422 Triade keinen negativen Effekt auf die Stabilität der Sekundärstrukturelemente zu besitzen. Die Mutation beider Histidinreste hingegen führt zu einer leichten Destabilisierung der Photolyasefaltung und somit zu einer geringeren Schmelztemperatur.

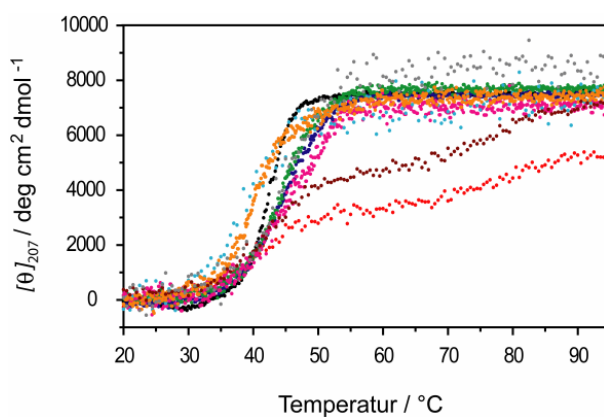


Abbildung 4.18: Schmelzkurven der verschiedenen *A. thaliana* (6-4)-DNA-Photolyasen. WT (schwarz), K246R (rot), H364N_L365R (blau), H368M (grün), H368Q (pink), H364N_L365R_H368M (türkis), H364N_L365R_H368Q (orange), W408Y (weinrot) und F427Q (grau). Die native *A. thaliana* (6-4)-Photolyase war in 2 mM Tris/HCl, 20 mM NaCl, 1 % Glycerin, pH 7.4 und ihre Mutanten waren in 5 mM Na₂HPO₄, 200 mM NaCl, 1 % Glycerin, pH 7.4 gelöst. Die Schmelzkurven wurden bei 207 nm von 20°C bis 95°C mit $2^\circ\text{C}/\text{min}$ aufgenommen.

Sowohl die K246R als auch die W408Y Mutante der *A. thaliana* (6-4)-DNA-Photolyase weisen zwar einen etwas geringeren Schmelzpunkt bei 41°C auf, beide Proteine scheinen jedoch teilweise stabilisiert zu sein. Daher entfalten diese beiden Mutanten, im Gegensatz zum Wildtyp und den übrigen *A. thaliana* (6-4)-Photolyasemutanten, über mehrere Zwischenzustände. Hierbei denaturiert die K246R Mutante nur unvollständig und die W408Y Mutante erst bei höheren Temperaturen. In beiden *A. thaliana* (6-4)-Photolyasen scheinen

demnach einige Sekundärstrukturelemente durch zusätzliche Wechselwirkungen mit dem FAD-Kofaktor stabilisiert zu sein.

Ein Vergleich mit der *D. salina* (6-4)-Photolyase, die sich je nach Redoxzustand zwischen 40 °C und 45 °C entfaltet, zeigt, dass die Schmelzpunkte der nativen *A. thaliana* (6-4)-Photolyase und ihrer Mutanten dem halophilen Enzym ähnlich sind.

4.2.3. UV/VIS Spektroskopische Untersuchungen der nativen *A. thaliana* (6-4)-Photolyase und ihrer Mutanten

Absorptionsspektren der verschiedenen *A. thaliana* (6-4)-DNA-Photolyasen wurden aufgenommen um zu prüfen, ob sie das für Photolyasen typische Absorptionsverhalten aufweisen.

At6-4PHR Mutante	Absorptionsmaxima / nm
K246R	358, 371, 427, 447, 473
H364N_L365R	360, 374, 429, 449, 475
H368M	359, 374, 427, 449, 475
H368Q	359, 373, 427, 449, 475
H364N_L365R_H368M	358, 374, 427, 447, 472
H364N_L365R_H368Q	359, 374, 428, 448, 474
W408Y	358, 371, 427, 448, 474
F427Q	360, 374, 428, 448, 475, 582, 639
Wildtyp	359, 373, 427, 448, 474

Tabelle 4.10: Absorptionsmaxima der verschiedenen *A. thaliana* (6-4)-DNA-Photolyasen.

Die UV/VIS-Spektren der aufgereinigten *A. thaliana* (6-4)-DNA-Photolyasemutanten zeigen ebenso wie das native Enzym Absorptionsmaxima im Bereich 359 und 448 nm, die charakteristisch für den oxidierten FAD Zustand sind. Diese Maxima weisen eine Feinstruktur mit lokalen Peaks bei 359 und 373 nm sowie 427, 448 und 474 nm auf (Abb. 4.19, Tab. 4.10, Anhang 6.6 und 6.7). In den UV/VIS-Spektren deuten die Schulter bei 427 nm und die Feinstruktur im UV-A Peak an, dass sich das nichtkovalent gebundene FAD in einer hydrophoben Umgebung befindet.^[149, 163] Demnach scheint die Faltung der Flavinbindungsdomäne der *A. thaliana* (6-4)-Mutanten intakt und nicht durch den Austausch

der nativen Aminosäuren gestört zu sein. Lediglich die F427Q Mutante besitzt zwei zusätzliche Absorptionsmaxima bei 582 und 639 nm, die ca. 5 % der Photolyase in der neutralen semichinoiden FAD Form repräsentieren. Folglich scheint das eingefügte Glutamin, im Gegensatz zum nativen Phenylalanin, den halbreduzierten FAD Zustand geringfügig zu stabilisieren.

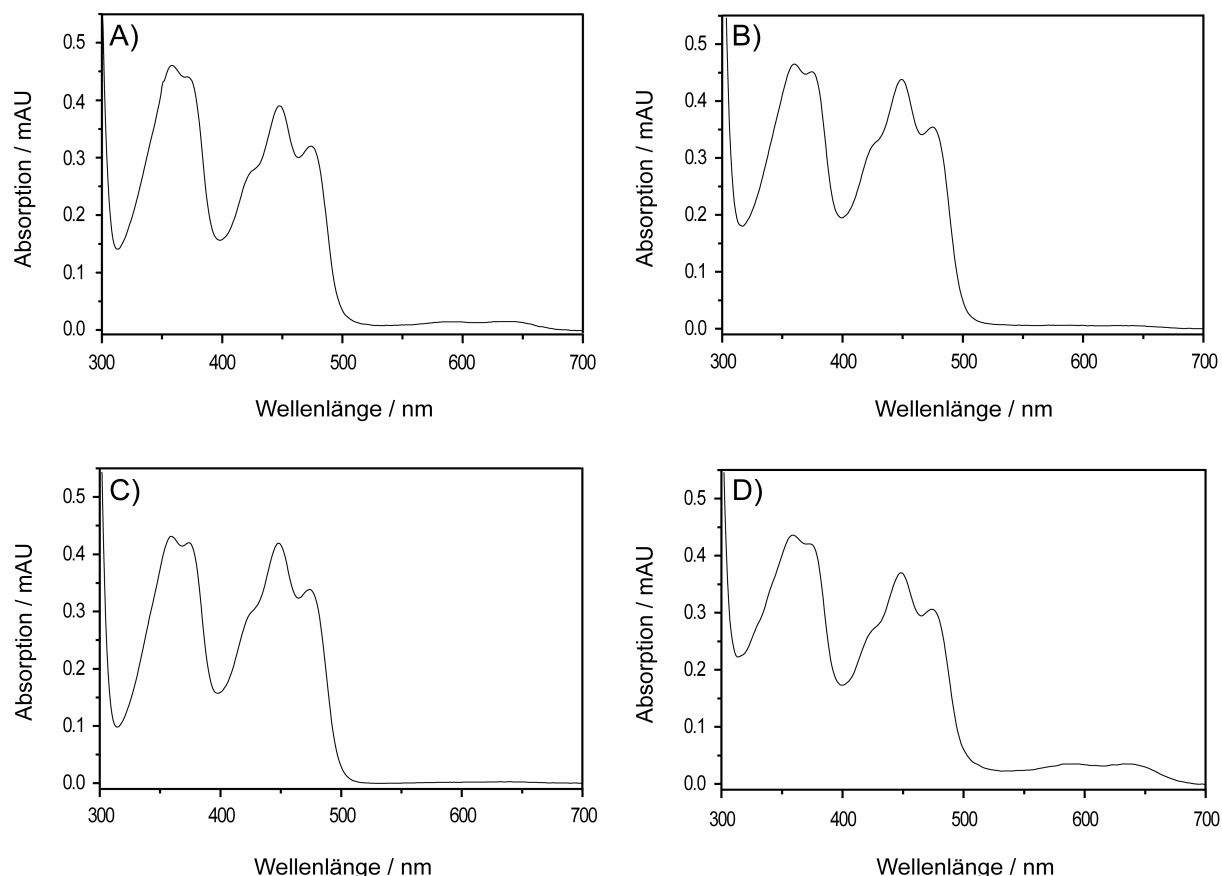


Abbildung 4.19: UV/VIS Absorptionsspektren verschiedener *A. thaliana* (6-4)-Photolyasen. A) Native Photolyase, B) H364N_L365R, C) H364N_L365R_H368Q, D) F427Q Mutanten. Die Photolyasen (45 – 60 μ M) waren in 50 mM Na_2HPO_4 , 500 mM NaCl, pH 7.4 gelöst und die Spektren wurden bei 15 °C aufgenommen.

Des Weiteren besaßen sowohl die aufgereinigte native *A. thaliana* (6-4)-Photolyase als auch ihre Mutanten keinen Antennenkofaktor. Einerseits konnte dies aufgrund der fehlenden Absorptionsmaxima im Bereich von 375 und 410 nm bzw. bei ~ 440 nm verifiziert werden, die eingebautes MTHF oder 8-HDF repräsentieren. Andererseits konnten anhand eines Photolyase/FAD Verhältnisses von $\sim 1:1$ bzw. ähnlicher $\text{OD}_{450/280}$ Quotienten, FAD und FMN als Antennenkofaktor ausgeschlossen werden.^[8, 164-166]

In den folgenden Experimenten sollten die oxidierten *A. thaliana* (6-4)-DNA-Photolyasen vollständig reduziert werden, um so die katalytisch aktiven Enzyme zu erhalten.

Experimente, die native (6-4)-Photolyase durch Lichtbestrahlung in Gegenwart von 1 mM DTT zu photoaktivieren, lieferten weder unter aeroben noch unter anaeroben Bedingungen das vollständig reduzierte Protein. Während der Photoaktivierung aggregierte die *A. thaliana* (6-4)-Photolyase, so dass der Reduktionsvorgang abgebrochen werden musste (Anhang 6.8). Somit standen diese Beobachtungen im Gegensatz zu der in Gegenwart von DTT extrahierten *A. thaliana* (6-4)-Photolyase, die unter anaeroben Stickstoffbedingungen mit einem He-Cd-Laser reduziert werden konnte.^[167]

Die vollständig reduzierte katalytisch aktive FAD-Spezies der *A. thaliana* (6-4)-Photolyasen konnte jedoch unter aeroben Bedingungen durch chemische Reduktion mittels 10 mM Natriumdithionit unter Lichtausschluss erhalten werden (Abb. 4.20, Anhang 6.9).

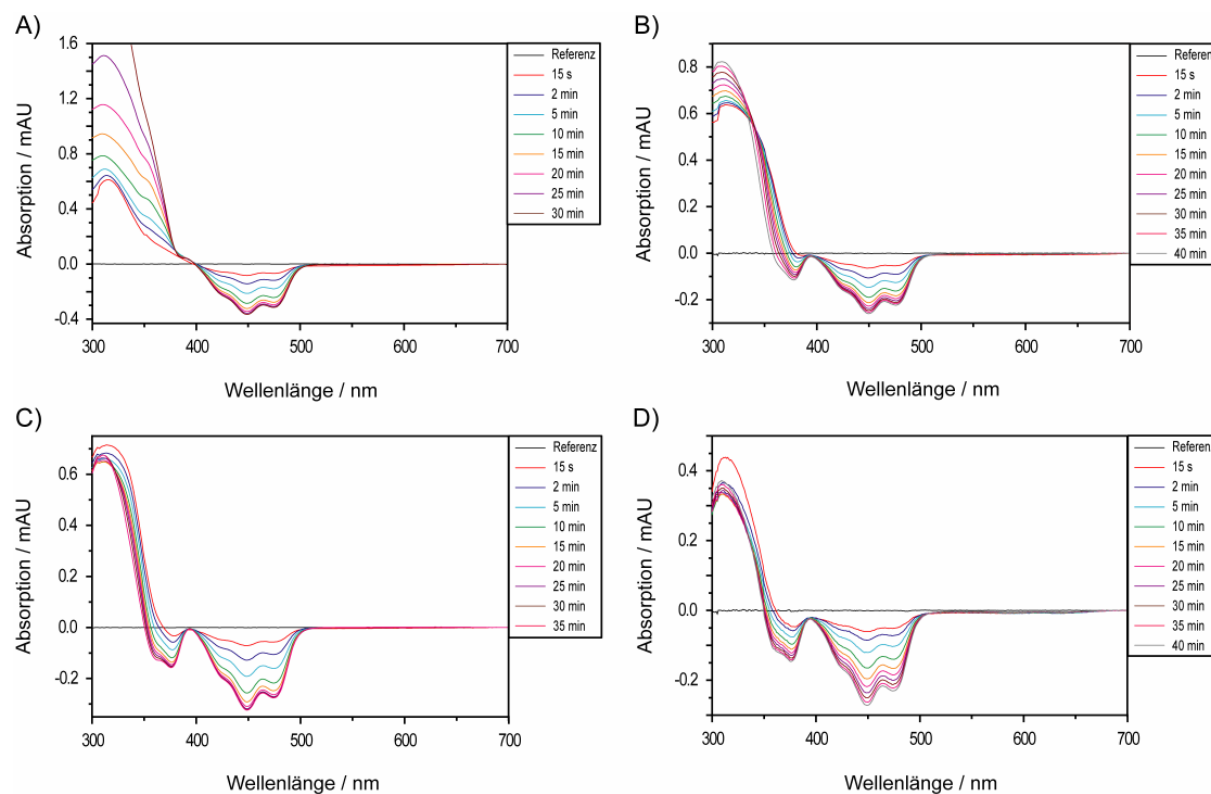


Abbildung 4.20: Differenzspektren verschiedener *A. thaliana* (6-4)-DNA-Photolyasen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Zugabe von 10 mM Natriumdithionit. A) Native Photolyase, B) H364N_L365R, C) H364N_L365R_H368Q, D) F427Q Mutanten. Die spektroskopischen Bedingungen sind analog zu Abb. 4.19.

Die Ausbildung der vollständig reduzierten (6-4)-Photolyase erfolgte nach 30 bis 40 min direkt aus den oxidierten Enzymen, ohne dass zwischenzeitlich der neutrale semichinoide FAD Zustand akkumuliert wurde. Im Verlauf der chemischen Reduktion konnte die Generierung der vollständig reduzierten Photolyase durch die starke Verringerung der Absorptionsmaxima bei 427, 448 und 474 nm verfolgt werden. Im nativen Enzym wurde die

Verringerung des Doppelmaximums bei 359 bis 373 nm durch eine Absorptionszunahme im Bereich von 300 bis 390 nm überlagert. Diese Absorptionszunahme wurde durch die Reaktion von FAD mit Natriumdithionit bzw. in diesem durch Oxidation enthaltenem Natriumsulfit bedingt.^[168, 169] Die Mutanten der *A. thaliana* (6-4)-Photolyase zeigten ebenfalls diesen Effekt, jedoch konnte in diesen ein noch schwach ausgeprägtes Absinken des Doppelmaximums im Bereich von 359 bis 373 nm beobachtet werden. Da neben der nativen *A. thaliana* (6-4)-Photolyase auch ihre Mutanten unter den gleichen Bedingungen chemisch reduziert und aktiviert werden konnten, wird wahrscheinlich das Redoxverhalten des pflanzlichen Enzyms nicht durch den Austausch der jeweiligen Aminosäurereste beeinflusst.

4.2.4. DNA-Bindungs- und Reparaturassays

Zunächst sollten die Dissoziationskonstanten der nativen *A. thaliana* (6-4)-Photolyase mit doppelsträngiger und einzelsträngiger ungeschädigter DNA sowie mit doppelsträngiger den CPD-Schaden enthaltender DNA bestimmt werden. Diese Dissoziationskonstanten werden benötigt, um geeignete Rahmenbedingungen für die nachfolgenden Dissoziations- und Reparaturassays festzulegen. Auf diese Weise sollte eine erfolgreiche Bindung an die verwendeten CPD-haltigen bzw. ungeschädigten Oligonukleotide gewährleistet werden.

Die Dissoziationskonstanten der oxidierten *A. thaliana* (6-4)-Photolyase wurden unter Verwendung von 2 nM IRD700 markiertem 50-mer Oligonukleotid ermittelt, welches für doppelsträngige Experimente zuvor hybridisiert wurde. Die Konzentrationen der *A. thaliana* (6-4)-Photolyase wurde hierbei von 2 bis 100 nM variiert. Mit dem Odyssey *Infrared Imaging System* (LI-COR Biosciences) wurden aus einem Polyacrylamidgel die Intensitäten der ungebundenen DNA quantifiziert und in prozentuale DNA-Bindung umgerechnet. Die Dissoziationskonstanten wurden mit einer Hill-Funktion in Abhängigkeit von der Anzahl der gebundenen Monomeren *A. thaliana* (6-4)-Photolyasen bestimmt (Abb. 4.21 und Tab. 4.11).

Die *A. thaliana* (6-4)-Photolyase weist sowohl für die Bindung an das ungeschädigte als auch an das CPD-haltige 50-mer Oligonukleotid ähnliche Dissoziationskonstanten im Bereich von 25 bzw. 17.5 nM auf. Die kleinere für die Bindung an das CPD-haltige Oligonukleotid erhaltene Dissoziationskonstante deutet an, dass die im oxidierten Zustand vorliegende *A. thaliana* (6-4)-Photolyase möglicherweise eine Veränderung des DNA-Doppelstranges wahrnimmt und, dadurch induziert, leichter an diesen bindet. Des Weiteren sind beide in Gegenwart von doppelsträngiger DNA ermittelten Dissoziationskonstanten um den Faktor ~ 3 geringer als die Dissoziationskonstanten für die Bindung der *A. thaliana* (6-4)-Photolyase an

das einzelsträngige Oligonukleotid. Diese Dissoziationskonstanten deuten an, dass das oxidierte *A. thaliana* Enzym, im Gegensatz zur oxidierten *D. salina* (6-4)-Photolyase (Abschnitt 4.3.4), eine erhöhte Bindungsspezifität für doppelsträngige DNA aufweist. Zudem konnte die Bindung mehrerer *A. thaliana* (6-4)-Photolyasen an ein 50-mer Oligonukleotid beobachtet werden. Ähnlich der oxidierten *D. salina* (6-4)-Photolyase trat dieser Effekt, bevorzugt für die Bindung des oxidierten *A. thaliana* Enzyms an einzelsträngige ungeschädigte DNA auf. Diese Beobachtung stimmt mit DNase I *Footprint* Experimenten und dem zuvor anhand der Kristallstrukturen der *D. melanogaster* (6-4)-und *A. nidulans* CPD-Photolyasen beobachteten DNA-Bindungsverhalten überein, in denen die DNA-Reparaturenzyme mit ~ 11 Basen wechselwirken.^[75, 103, 104] Somit wäre ausreichend Platz für die Bindung weiterer *A. thaliana* (6-4)-Photolyasen am 50-mer Oligonukleotid vorhanden.

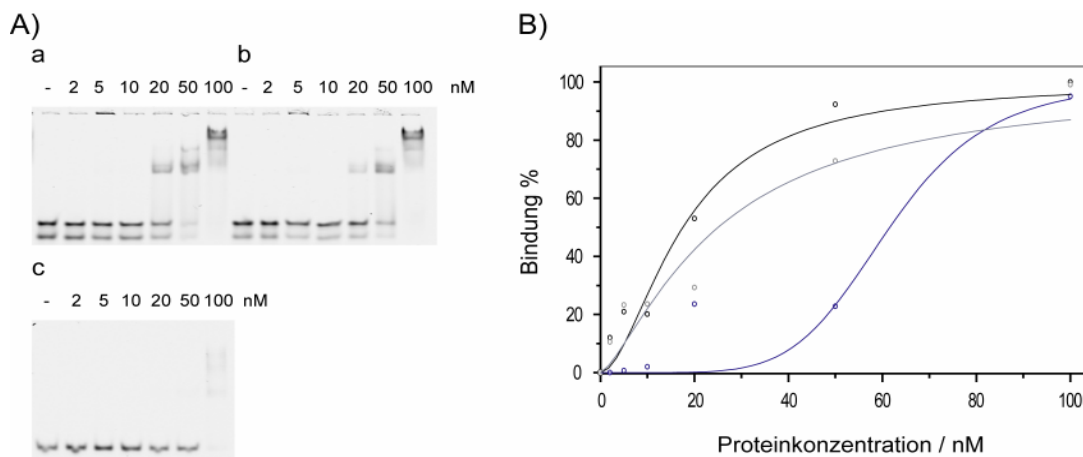


Abbildung 4.21: A) Bindung der oxidierten *A. thaliana* (6-4)-Photolyase an ein doppelsträngiges ungeschädigtes 50-mer Oligonukleotid und B) Direkt-lineare Auftragung dieser DNA-Bindung. Doppelsträngiges, ungeschädigtes (a, Schwarz), doppelsträngiges, CPD-haltiges (b, grau) und einzelsträngiges, ungeschädigtes (c, blau) Oligonukleotid. Das Oligonukleotid (2 nM) wurde mit ansteigenden Konzentrationen der (6-4)-Photolyase gemischt und nach 30 minütiger Inkubation auf ein 6 % Polyacrylamidgel aufgetragen. Der E-S Komplex wurde mit der Gelshift-Methode von der ungebundenen DNA getrennt. Die bei doppelsträngigen Experimenten zu beobachtende ungeschiftete Doppelbande entsteht aufgrund einer unvollständigen Hybridisierung beider verwendeter Oligonukleotide.

Die unspezifischen Dissoziationskonstanten der oxidierten *A. thaliana* (6-4)-Photolyase liegen in derselben Größenordnung, wie die für die Bindung des oxidierten *D. salina* Enzyms (35.9 und 37.9 nM) an ein ungeschädigtes 50-mer Oligonukleotid erhaltenen Werte (Abschnitt 4.3.4).

<i>A. thaliana</i> (6-4)-Photolyase	Bindungsverhalten
ds Oligo	$K_d = 25.0 \text{ nM} \pm 5.0 \text{ nM}$ $n = 1.8 \pm 0.4$
ds CPD-Oligo	$K_d = 17.5 \text{ nM} \pm 2.6 \text{ nM}$ $n = 1.4 \pm 0.3$
ss Oligo	$K_d = 61.6 \text{ nM} \pm 7.6 \text{ nM}$ $n = 5.7 \pm 2.9$

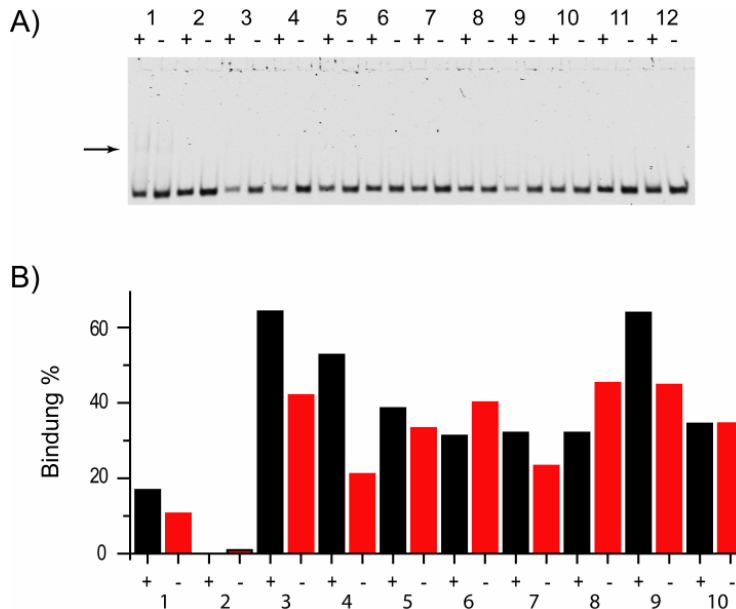
Tabelle 4.11: Dissoziationskonstanten der Bindung der oxidierten *A. thaliana* (6-4)-Photolyase an verschiedene 50-mer Oligonukleotide.

Da 100 nM *A. thaliana* (6-4)-Photolyase das verwendete 50-mer Oligonukleotid in einer Konzentration von 2 nM nahezu vollständig binden, wurde diese Grundbedingung für die nachfolgenden Bindungsstudien und Reparaturassays verwendet.

Anhand von Bindungsstudien sollte überprüft werden, ob in der *A. thaliana* (6-4)-Photolyase der Austausch einiger konservierten Aminosäuren in Richtung CPD-Photolyase oder DASH Cryptochrom zur Bindung des CPD-Schadens führt.

Diese Bindungsexperimente der nativen *A. thaliana* (6-4)-Photolyase, sowie ihrer Mutanten wurden in Gegenwart eines 1000 fachen Überschusses an komplementärem Oligonukleotid durchgeführt, welches als Kompetitor und aufgrund der ähnlichen Dissoziationskonstanten zu einzelsträngiger DNA, die unspezifische DNA-Bindung maskieren sollte. Auf diese Weise führt eine spezifische Bindung an das CPD-haltige Oligonukleotid zu einem Gelshift, unspezifisches Bindungsverhalten zeigt jedoch das frei vorliegende ungeshiftete Oligonukleotid. Das Bindungsverhalten sollte anhand der Intensitäten der geshifteten DNA-Banden des Photolyase/ DNA-Komplexes bezogen auf die gesamte Oligonukleotidintensität quantifiziert werden. Jedoch trat während der Auswertung das folgende Problem auf: Es konnte sowohl für die *A. thaliana* (6-4)-Photolyase als auch für die als Positivkontrolle verwendete *A. nidulans* CPD-Photolyase trotz einer auftretenden Verringerung der Intensität der ungeshifteten Bande nur in den seltensten Fällen die geshiftete Bande dokumentiert werden (Abb. 4.22A). Hierbei konnte nicht geklärt werden, ob die verschiedenen Photolyasen nicht von der DNA ins Gel transportiert wurden, da möglicherweise mehrere Enzyme an ein Oligonukleotid gebunden waren. Außerdem könnte durch das Vorhandensein mehrerer Photolyase/DNA-Komplexe die jeweilige Oligonukleotidkonzentration für die Detektion zu gering gewesen sein. Ein nicht vollständig stabilisierter Photolyase/ DNA-Komplex kann jedoch ausgeschlossen werden, da auf den Gelen zur Bestimmung der

Dissoziationskonstanten deutlich die geshifteten Komplexe beobachtet werden konnten. Bedingt durch dieses Problem wurde näherungsweise die DNA-Bindung der jeweiligen Photolyase anhand der geringer werdenden Intensität der ungeschifteten Bande bestimmt.



Abbildungung 4.22: A) Bindungsgele von verschiedenen DNA-Photolyasen an ein T<>T Dimer haltiges (+) bzw. an ein ungeschädigtes (-) doppelsträngiges 50-mer Oligonukleotid. Die 6 % Polyacrylamidgele zeigen die 1) *A. nidulans* CPD-Photolyase, 2) native *A. thaliana* (6-4)-Photolyase und die 3) K246R 4) H364N_L365R, 5) H368M, 6) H368Q, 7) H364N_L365R_H368M, 8) H364N_L365R_H368Q, 9) W408Y bzw. 10) F427Q Mutante der *A. thaliana* (6-4)-Photolyase. Die Proben 11) und 12) enthalten als Referenz anstelle der Photolyase den jeweils verwendeten Puffer (Abschnitt 3.3.10). Der Pfeil kennzeichnet die Position der erwarteten geshifteten DNA-Bande B) Quantitative Bindungsdaten dieses Gelshiftexperiments.

Die Auswertung der Bindungsstudien zeigte für die native *A. thaliana* (6-4)-Photolyase das erwartete Resultat, bei dem das Enzym gleichermaßen weder ein spezifisches Bindungsverhalten zum CPD-haltigen noch eine unspezifische Bindung an das ungeschädigte doppelsträngige Oligonukleotid zeigt. Für die als Referenz verwendete *A. nidulans* CPD-Photolyase konnte eine erhöhte spezifische Bindung von 16 % an das CPD-geschädigte Oligonukleotid beobachtet werden. Jedoch zeigt das CPD-Enzym auch eine 10 % Bindung an das ungeschädigte Oligonukleotid. Demnach scheint die CPD-Photolyase eine höhere Affinität zu doppelsträngiger DNA allgemein, im Vergleich zu der einzelsträngigen als Kompetitor verwendeten DNA zu besitzen als die pflanzliche (6-4)-Photolyase. Folglich scheinen die Grundbedingungen des Bindungsassays zwar für die native *A. thaliana* (6-4)-Photolyase optimal zu sein, hingegen nicht für das CPD-Enzym. Die Mutanten der

A. thaliana (6-4)-Photolyase zeigten hingegen ein noch stärkeres Bindungsverhalten sowohl an das CPD-haltige als auch das ungeschädigte doppelsträngige 50-mer Oligonukleotid (Abb. 4.22). Daher scheinen die eingefügten Mutationen die Dissoziationskonstanten für die Bindung an doppelsträngige DNA insgesamt herabzusetzen. Weiterhin könnten sich dieselben für die Bindung an einzelsträngige Oligonukleotide zu erhöhen. Für die K246R, H364N_L365R und W408Y-Mutanten konnte sogar eine stärkere Zunahme der CPD-spezifischen im Vergleich zur unspezifischen Bindung detektiert werden. Dieser Effekt ist im Fall der H364N_L365R der *A. thaliana* (6-4)-Photolyasemutante am stärksten zu beobachten. Da aufgrund der zuvor beschriebenen Effekte keine eindeutige spezifische Bindung an den CPD-Schaden, d.h. keine spezifische Erkennung dieses Schadens, ermittelt werden konnte, wurde ein Reparaturassay mit der vollständig reduzierten nativen *A. thaliana* (6-4)-Photolyase und ihren reduzierten Mutanten durchgeführt. Sollten die Mutanten der *A. thaliana* (6-4)-Photolyase im Verlaufe dieses Assays den CPD-Schaden reparieren, kann auch eine erfolgreiche Erkennung und Bindung des CPD-Schadens vorausgesetzt werden. Der Reparaturassay wurde für das native *A. thaliana* Enzym und seine Mutanten unter Verwendung eines doppelsträngigen den CPD-Schaden enthaltenden 50-mer Oligonukleotids durchgeführt. Für die native (6-4)-Photolyase und ihre DASH Cryptochrom Mutanten wurde für den Reparaturassay zusätzlich ein doppelsträngiges 50-mer Oligonukleotid, bei dem sich der CPD-Schaden aufgrund von vier fehlenden Watson-Crick-Basenpaaren in einem ungebundenen Loop befindet, verwendet. Auf diese Weise soll die Reparatur des CPD-Schadens für diese Mutanten erleichtert werden, da DASH Cryptochrome nicht in der Lage sind, den CPD-Schaden während der Reparatur aus dem DNA-Doppelstrang heraus zu drehen.^[117] Für den Reparaturassay wurden die den CPD-Schaden und die *A. thaliana* (6-4)-Photolyasen enthaltenen Reaktionsansätze belichtet (365 nm mit 2.4 mW/cm²). Zur Untersuchung der Reparaturaktivität wurden vor Belichtung, nach 10 min, 30 min und 1 h Proben entnommen und diese mit *VspI* verdaut (Abschnitt 3.3.11). Hierbei werden reparierte doppelsträngige 50-mer Oligonukleotide verdaut, resultierend in 25 nt Banden, wohingegen CPD-haltige Oligonukleotide nicht geschnitten werden können. Auf diese Weise kann die Reparaturaktivität der nativen *A. thaliana* (6-4)-Photolyase und ihrer Mutanten verfolgt und dokumentiert werden.

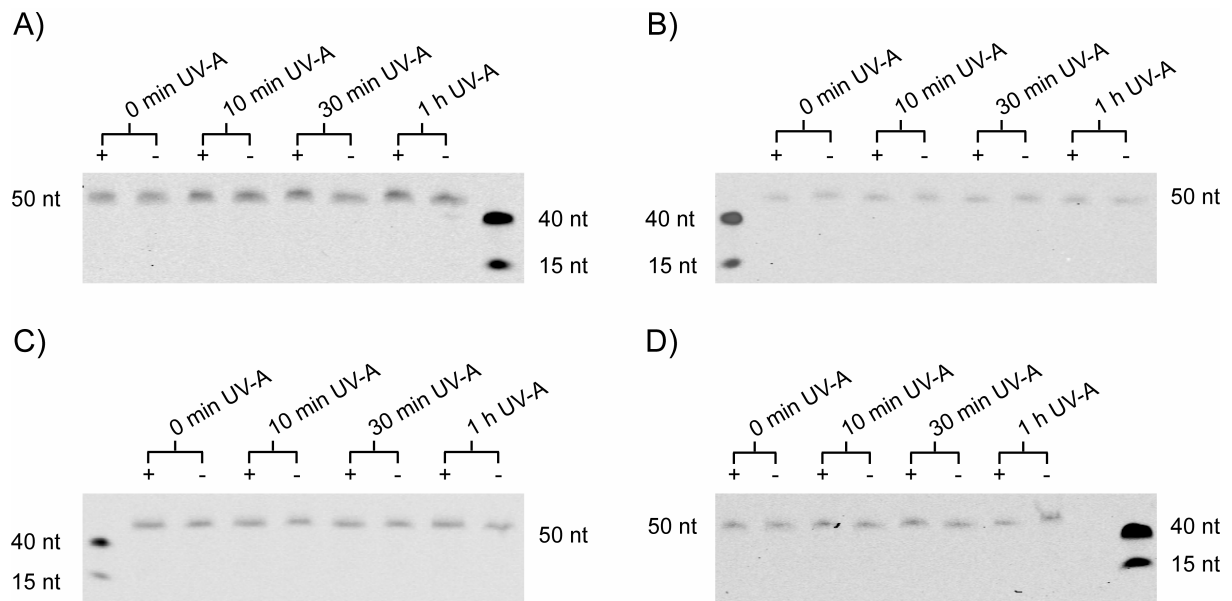


Abbildung 4.23: Reparaturassays von verschiedenen reduzierten *A. thaliana* (6-4)-DNA-Photolyasen unter Verwendung eines T\leftrightarrowT Dimer haltigen 50-mer Oligonukleotids. Die 6 % Harnstoffgele zeigen die A) native Photolyase und die B) K246R, C) H364N_L365R und D) H368M Mutanten. Proben wurden vor der Belichtung bei 365 nm, nach 10, 30 und 60 min entnommen, halbiert und jeweils ein Ansatz mit *VspI* verdaut. Am linken bzw. rechten Rand des jeweiligen Gels befindet sich ein Marker bestehend aus einem 40-mer und 15-mer IRD700 markiertem Oligonukleotid.

Die Auswertung der aufgetrennten Oligonukleotidbanden erfolgte wie bei den vorherigen Experimenten mit dem Odyssey System. Jedoch konnte weder unter Verwendung des doppelsträngigen noch unter Einsatz des die Loopstruktur enthaltenden CPD-haltigen 50-mer Oligonukleotids die das reparierte Oligonukleotid repräsentierende Bande bei 25 nt detektiert werden. Demnach waren sowohl die vollständig reduzierte native *A. thaliana* (6-4)-Photolyase als auch ihre unterschiedlichen reduzierten Mutanten nicht in der Lage den CPD- Schaden zu reparieren, im Gegensatz zur *E. coli* Photolyase (Abb. 4.23, 4.24 und Anhang 6.10 und 6.11).^[170] Folglich besitzen alle *A. thaliana* (6-4)-Photolyasemutanten nicht die für die Reparatur des CPD-Schadens essentiellen Wechselwirkungen.

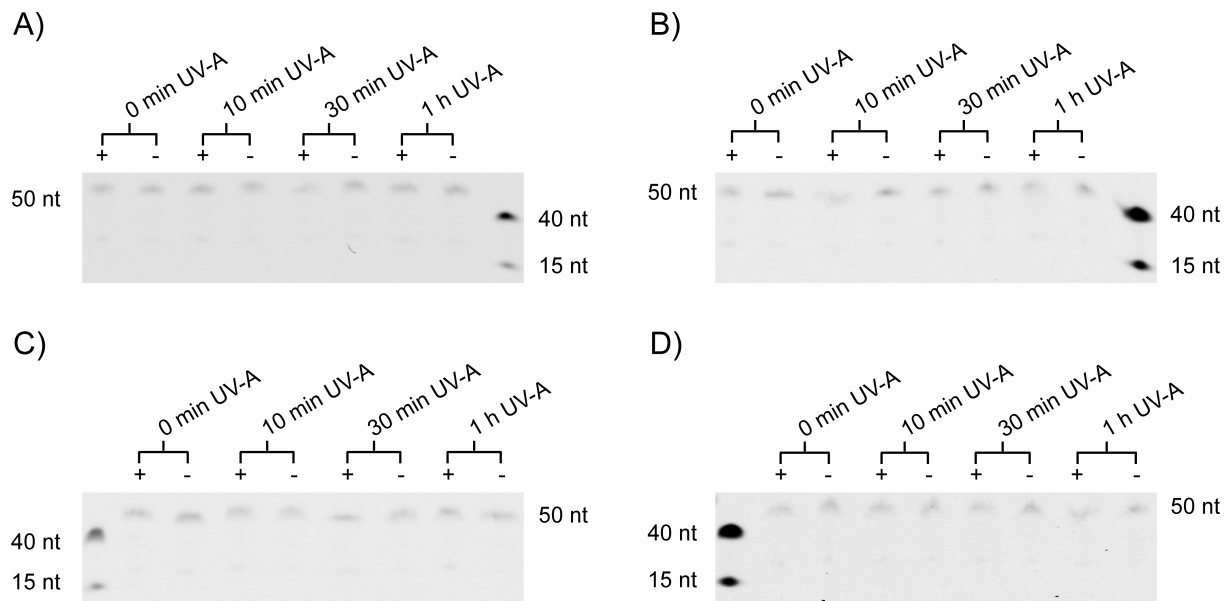


Abbildung 4.24: Reparaturassays von verschiedenen reduzierten *A. thaliana* (6-4)-DNA-Photolyasen unter Verwendung eines ein T<>T Dimer und eine Loopstruktur bestehend aus vier Basen enthaltenden 50-mer Oligonukleotids. Die 6 % Harnstoffgele zeigen die A) native Photolyase und die B) H368Q, C) H364N_L365R_H368Q und D) W408Y Mutanten. Proben wurden analog zu Abb. 4.24 behandelt. Am linken bzw. rechten Rand des jeweiligen Gels befindet sich ein Marker bestehend aus einem 40-mer und 15-mer IRD700 markiertem Oligonukleotid.

4.2.5. Kristallisation

Um die Struktur der *A. thaliana* (6-4)-DNA-Photolyase zu bestimmen, sollte diese zunächst kristallisiert werden. Anhand dieser Kristallstrukturen sollten Rückschlüsse über die DNA-Bindung bzw. den Reparaturmechanismus und einen möglichen Antennenkofaktor gezogen werden.

Die Proteinkristallisation der in Puffer F aufgereinigten und konzentrierten *A. thaliana* (6-4)-DNA-Photolyase wurde nach der Sitting Drop Methode bei 4 und 18 °C unter Sicherheitsrotlicht durchgeführt. Hierbei wurden die Konzentrationen der (6-4)-Photolyase von 5 über 13, 15, 19 und 20 bis hin zu 30 mg/mL variiert. In einem Screening wurden 5 % Glycerin in die Proteinlösung pipettiert, um die *A. thaliana* (6-4)-Photolyase während der Kristallisation zu stabilisieren. Ebenfalls versucht wurde die Kristallisation der *A. thaliana* (6-4)-DNA-Photolyase in Gegenwart verschiedener Reduktionsmittel, wobei 5 und 10 mM DTT bzw. 10 mM Natriumdithionit verwendet wurden. Die Reduktionsmittel sollten die (6-4)-Photolyase im halbreduzierten bzw. vollständig reduzierten Zustand halten. Auf diese Weise könnte zum Beispiel die Flexibilität des Proteins reduziert und somit die Bildung eines Kristallisationskeims erleichtert werden. Eine erfolgreiche Kristallisation unter reduzierenden

Bedingungen könnte die Struktur der *A. thaliana* (6-4)-Photolyase in ihrer aktiven Form liefern.

Die Cokristallisation der *A. thaliana* (6-4)-DNA-Photolyase wurde mit einem doppelsträngigen den (6-4)-Schaden enthaltenden Oligonukleotid (5'-ACAGCGGT(6-4)TGCAGGT-3') im Verhältnis 1:1.25 durchgeführt. Hierbei sollte das Oligonukleotid die Kristallisationsbedingungen des Proteins ändern bzw. verbessern und somit die Kristallisation initiieren. Anhand eines Kristalls der (6-4)-Photolyase mit dem (6-4)-geschädigten Oligonukleotid sollten Aussagen über die Protein-DNA-Wechselwirkungen und daraus folgend der Reaktionsmechanismus abgeleitet und beides mit der *A. nidulans* CPD-Photolyase und dem *A. thaliana* DASH Cryptochrom 3 verglichen werden.

Neben der nativen *A. thaliana* (6-4)-Photolyase wurden ebenso Kristallisationsansätze mit der H368Q Mutante in der Konzentration von ~ 11.5 mg/ mL ohne und in Gegenwart von 5 % Glycerin bei 4 °C angesetzt.

Für die Kristallisation wurden folgende Screens verwendet: Sigma Basic, Extension, Cryo und Nextal Classics Suite, Classics Lite Suite, PACT, JCSG, MBClassI Suite, MBClassII Suite, Cryos Suite, Anions Suite. Im Anhang 6.12 ist aufgeführt welcher Screen in Verbindung mit welchen der zuvor aufgeführten Parameter auspipettiert wurde.

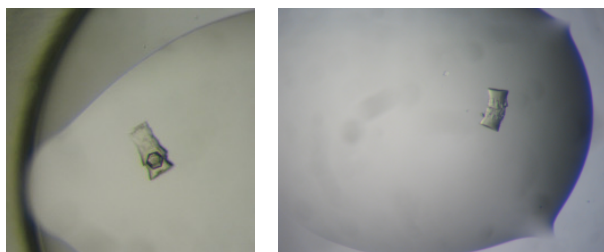


Abbildung 4.25: Während der Kristallisation der *A. thaliana* (6-4)-DNA-Photolyase erhaltene Kristalle. Links: 0.0058 M NiCl_2 , 0.085 M Tris/HCl, pH 8.5, 0.85 M LiSO_4 , 15 % Glycerin, Rechts: 0.0058 M NiCl_2 , 0.085 M Tris/HCl, pH 8.0, 1.15 M LiSO_4 , 15 % Glycerin. Die Kristalle wurden bei 4 °C nach 1 bis 2 Wochen erhalten.

Während der Dokumentation stellte sich heraus, dass die Kristallisation bei 4 °C der gegenüber 18 °C zu bevorzugen war, da bei der höheren Temperatur bereits nach zwei bis vier Wochen denaturiertes Protein beobachtet wurde. Im Gegensatz dazu konnte jedoch bei 4 °C über einen Zeitraum von sechs Monaten keine denaturierte *A. thaliana* (6-4)-Photolyase dokumentiert werden. Bei keiner dieser unterschiedlichen Kristallisationsversuche konnten im Verlauf der Dokumentation von mindestens einem Jahr streuende Kristalle erhalten werden.

Beobachtete Kristalle wurden entweder als Salz identifiziert, streuten nicht oder konnten nicht reproduziert werden (Abb. 4.25).

4.3. Photochemische Analyse der *D. salina* (6-4)-DNA-Photolyase

Die *Dunaliella salina* (6-4)-DNA-Photolyase (600 aa, Molekulargewicht 67.1 kDa, Swiss-Prot Eintrag Q52Z99) ist die erste den (6-4)-Schaden reparierende Photolyase, die in einem einzelligen Organismus entdeckt wurde. Sie besitzt im Vergleich zur *A. thaliana* (6-4)-Photolyase neben der N-terminalen Photolyasedomäne (G49-S228) und der C-terminalen FAD Bindungsdomäne (G257-Y534) einen für (6-4)-Photolyasen extrem langen ungeordneten N-terminalen (M1-Q48) und α -helikalen C-terminalen (G544-G574) Bereich. (Abb. 4.26).

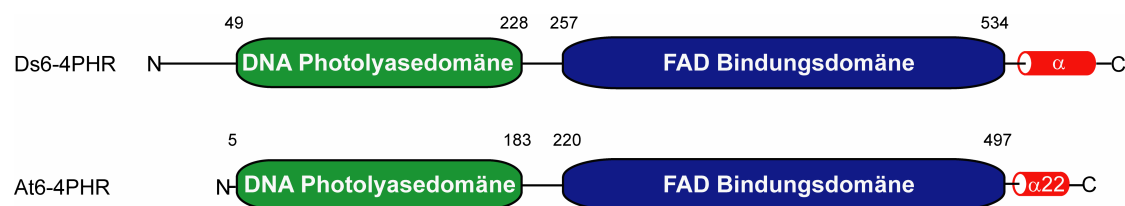


Abbildung 4.26: Domänenbau zweier (6-4)-DNA-Photolyasen. Die Domänen wurden vom Pfam/ Sanger Server (<http://pfam.sanger.ac.uk/protein?acc=Q52Z99>) und die C-terminale $\alpha 22$ -Helix von der *A. thaliana* (6-4)-DNA-Photolyasestruktur übernommen (PDB ID: 3FY4). Ds6-4PHR: *D. salina* (6-4)-DNA-Photolyase (Q52Z99), At6-4PHR: *A. thaliana* (6-4)-DNA-Photolyase (O48652).

Ähnliche C-terminale α -Helices dienen in den verwandten pflanzlichen und tierischen Cryptochromen zur Stabilisierung und Lokalisierung bzw. sind an der Phototransduktion beteiligt. Am Beispiel des *A. thaliana* Cryptochrom 1 konnte gezeigt werden, dass sich lichtinduziert die Konformation der im Photorezeptor vorliegenden C-terminalen Verlängerung ändert.^[26] Die Aufreinigung und biophysikalische Analyse der *D. salina* (6-4)-Photolyase soll helfen eventuell im C-terminalen Bereich des Reparaturenzyms auftretende Veränderungen zu charakterisieren.

4.3.1. Expression und Aufreinigung

Das für die *D. salina* (6-4)-DNA-Photolyase codierende Gen wurde von der GENEART AG hergestellt und über *Nde*I und *Eco*RI Schnittstellen in den pET28a Expressionsvektor kloniert. Die Basensequenz des synthetischen Gens wurde hierbei künstlich modifiziert, so dass sie nur die Codons enthält, für die der Expressionsorganismus *E. coli* leicht die für die Proteinproduktion ausreichenden Mengen tRNAs zur Verfügung stellen kann (Anhang 6.13).

Die rekombinante Produktion der *D. salina* (6-4)-DNA-Photolyase wurde unter den Bedingungen der Autoinduktion bei 25 °C in 6 L TB-Medium durchgeführt. Als Expressionsstamm dienten *E. coli* BL21-Gold (DE3). Nach 24 h Expression wurden die Zellen geerntet, in Puffer B mit 2 M NaCl resuspendiert und bis zum Zellaufschluss bei - 80 °C eingefroren. Durch Zellaufschluss mit dem Emulsifier (*Avestin*) in Gegenwart von 1500 U DNase I konnten zwischen 20 und 35 % lösliche *D. salina* (6-4)-Photolyase erhalten werden. Da an die lösliche (6-4)-Photolyase nach dem Aufschluss noch große Mengen an DNA gebunden waren, wurden weitere 1000 U DNase I hinzugefügt und die Aufreinigung in Gegenwart von 2 M NaCl durchgeführt (Abb. 4.28). Des Weiteren diente die hohe Salzkonzentration im verwendeten Puffer während der Aufreinigung dazu, die *in vitro* zur Aggregation neigende *D. salina* (6-4)-Photolyase in Lösung zu halten. Eine Ursache für die erhöhte Aggregationsneigung der (6-4)-Photolyase könnte die im Organismus *D. salina* durch Osmoregulation bis zu 50 % vorliegende Glycerinkonzentration sein.^[171, 172] Neben der Verwendung eines salzreichen Puffers wurde zur Reduzierung von wiederholt auftretenden lichtinduzierten Aggregationen, die *D. salina* (6-4)-Photolyase vorwiegend lichtgeschützt gehandhabt. Die filtrierte Photolyaselösung wurde über eine 7 mL Ni-NTA Säule unter Verwendung eines Imidazolgradienten (von 0 auf 250 mM) über 12.5 Säulenvolumina aufgereinigt. Von der Ni-NTA Säule eluierte die von den meisten Verunreinigungen befreite (6-4)-Photolyase bei einer Imidazolkonzentration von 90 mM. Die grün gefärbten Proteinfractionen wurden nach Kontrolle durch ein 12 % SDS-PAGE Gel vereinigt und in Gegenwart von 10 bis 15 % Glycerin durch Ultrafiltration auf einem Konzentrator mit einem Ausschlussvolumen von 30 kDa ankonzentriert. Im Anschluss wurde durch Größenausschlusschromatographie mit einer Superdex 200 10/300 Säule in Puffer B die *D. salina* (6-4)-Photolyase weiter aufgereinigt. Die Photolyase wurde nach 13.7 mL mit einem dem Monomer entsprechendem apparenten Molekulargewicht von 67 kDa von der Säule eluiert (Abb. 4.27). Demnach liegt die native *D. salina* (6-4)-Photolyase wie die zuvor beschriebene pflanzliche *A. thaliana* (6-4)- Photolyase *in vitro* als Monomer vor.

Die blaugrün gefärbte *D. salina* (6-4)-DNA-Photolyase konnte sauber und in für die nachfolgenden Experimente ausreichenden Mengen von 6.5 mg/ 6 L Kultur aufgereinigt werden. Des Weiteren konnte das aufgereinigte (6-4)-Reparaturenzym bei - 20 °C über einen Zeitraum von mehreren Monaten gelagert werden.

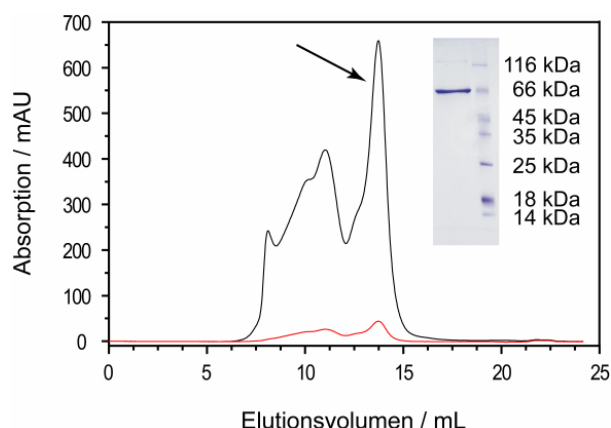


Abbildung 4.27: Elutionsprofil der Größenausschlusschromatographie der *D. salina* (6-4)-DNA-Photolyase. Für die Chromatographie wurde eine Superdex 200 10/300 Säule verwendet. Die Elution wurde bei 280 nm (schwarz) und 450 nm (rot) detektiert. Die aufgetragene *D. salina* (6-4)-DNA-Photolyase wurde bei einem R_f von 0.6 CV und einem OD_{450}/OD_{280} Quotienten von 0.067 von der Säule eluiert. Der Pfeil zeigt auf den Peak, der die Elution der aufgereinigten *D. salina* (6-4)-DNA-Photolyase repräsentiert. Eingebettet ist das 12 % SDS-PAGE Gel der aufgereinigten *D. salina* (6-4)-DNA-Photolyase zu sehen.

Zur Überprüfung eventuell noch in der aufgereinigten *D. salina* (6-4)-Photolyase enthaltener DNA-Mengen wurde zum einen der $OD_{280/260}$ Quotient bestimmt, und zum anderen das Enzym mit Phenol/ Chloroform gefällt und der Überstand auf ein Agarosegel aufgetragen. Der ermittelte $OD_{280/260}$ Quotient von 1.40 zeigt, dass weniger als 2 % DNA an die *D. salina* (6-4)-Photolyase gebunden sind und diese während des Aufreinigungsprozesses fast vollständig von der DNA befreit werden konnte. Auch konnte nach der Phenol/ Chloroform Fällung der Photolyase auf dem Agarosegel keine DNA mehr dokumentiert werden (Abb. 4.28). Die beobachtete blaugrüne Färbung zeigt, dass die aufgereinigte native *D. salina* (6-4)-Photolyase, ähnlich der *T. thermophilus* CPD-Photolyase teilweise im neutralen semichinoiden Zustand und nicht wie die *A. thaliana* (6-4)-Photolyase in der vollständig oxidierten Form vorliegt (Abb. 4.29).^[173, 174]

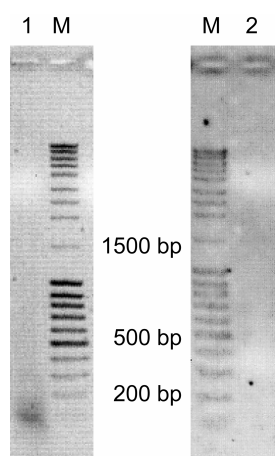


Abbildung 4.28: 1 % Agarosegele des wässrigen Überstandes der *D. salina* (6-4)-Photolyase nach der Phenol/Chloroform Fällung. Linkes Gel: DNA-haltige Photolyase nach Ni-NTA ohne Zusatz von DNase I und in 50 mM Na_2HPO_4 , 500 mM NaCl, 5 % Glycerin, pH 7.4. Rechtes Gel: DNA-freie Photolyase nach Größenausschlusschromatographie mit Zusatz von 2500 U DNase I und in 50 mM Na_2HPO_4 , 2 M NaCl, 5 % Glycerin, pH 7.4.

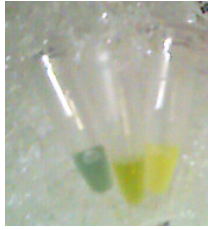


Abbildung 4.29: Aufgereinigte DNA-Photolyasen. Links: *D. salina* (6-4)-Photolyase, mitte: *T. thermophilus* CPD-Photolyase, rechts: *A. thaliana* (6-4)-Photolyase.

Ob der katalytische Kofaktor FAD während der Expression in *E. coli* homogen in die *D. salina* (6-4)-Photolyase eingebaut wurde, sollte durch den OD_{450/280} Quotienten und das Protein/ Chromophor Verhältnis analysiert werden. Der OD_{450/280} Quotient von 0.067 des *D. salina* Enzyms liegt in der selben Größenordnung wie der für die oxidierte *A. thaliana* (6-4)-Photolyase bestimmte Wert von 0.076 und liefert so einen ersten Hinweis auf die Vollbesetzung des katalytischen Kofaktors. Der etwas geringere OD_{450/280} Quotient der *D. salina* Photolyase lässt sich durch die anteilig vorhandene neutrale semichinoide FAD-Form erklären. Zur Bestimmung des Protein/ Kofaktor Verhältnisses wurde die *D. salina* Photolyase bekannter Konzentration mit TCA gefällt, die Absorption des freigesetzten FAD bei 450 nm gemessen und dessen Konzentration ermittelt. Das erhaltene Protein/ Kofaktor Verhältnis von 1:0.92 zeigt, dass der katalytische FAD Kofaktor in stöchiometrischen Mengen in die (6-4)-Photolyase eingebaut und während des Aufreinigungsprozesses nicht herausgelöst wurde.

4.3.2. Untersuchung der photochemischen Eigenschaften der *D. salina* (6-4)-Photolyase

Absorptionsspektren der *D. salina* (6-4)-DNA-Photolyase wurden aufgenommen, um zunächst zu klären in welchem Redoxzustand die aufgereinigte Photolyase vorlag. Weiter sollten ihr photochemisches Verhalten, d. h. die eventuelle Generierung verschiedener Redoxzustände, untersucht werden.

Das Absorptionsspektrum der aufgereinigten und im Dunkeln eingefrorenen und gelagerten *D. salina* (6-4)-DNA-Photolyase zeigt eine Mischung aus ca. 70-75 % oxidiertem und 25-30 % neutralem semichinoidem FAD Zustand. Hierbei repräsentieren die Absorptionsmaxima bei 360 nm und 450 nm den oxidierten Zustand, wobei jedes eine Feinstruktur mit lokalen Peaks bei 360 und 374 nm, sowie bei 423, 450 und 474 nm aufweist, und die Maxima bei 587 und 631 nm den neutralen semichinoiden Zustand (Abb. 4.30 und Tab. 4.12).^[29, 31, 32] Im UV/VIS-Spektrum der *D. salina* (6-4)-Photolyase deutet die Schulter bei 423 nm an, dass der katalytische FAD-Kofaktor in einer hydrophoben Umgebung

gebunden ist.^[149, 163] Dies konnte zuvor ebenfalls für die *A. thaliana* (6-4)-Photolyase beobachtet werden.

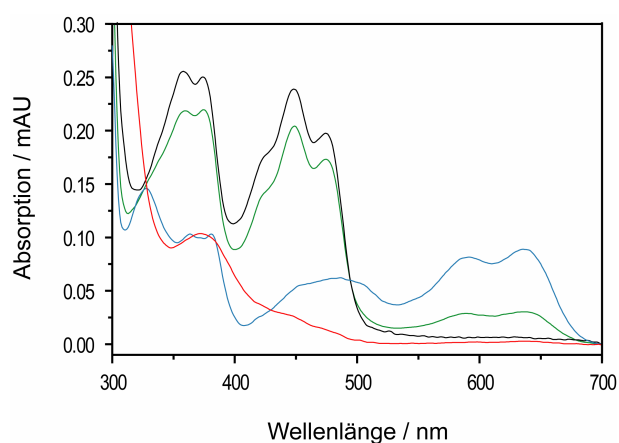


Abbildung 4.30: UV/VIS Absorptionsspektren der verschiedenen Redoxzustände der *D. salina* (6-4)-DNA-Photolyase. Vollständig oxidierte Form (schwarz), nach Aufreinigung erhaltene Mischform aus oxidiertem und neutralem semichinoidem Zustand (grün), neutrale semichinoide Form (türkis) und vollständig reduzierte Form (rot). Die Herstellung der reinen FAD-Redoxzustände des *D. salina* Enzym wird nachfolgend beschrieben. Die *D. salina* (6-4)-Photolyase (29.4 μ M) war in 50 mM Na_2HPO_4 , 2 M NaCl, 10 % Glycerin, pH 7.4 gelöst und die Spektren wurden bei 15 °C aufgenommen.

<i>D. salina</i> (6-4)-DNA-Photolyase	Absorptionsmaxima / nm
Oxidierte Form	359, 374, 423, 450, 474
Gemischte Form	360, 374, 423, 450, 474, 587, 631
Neutrale semichinoide Form	328, 362, 374, 454, 473, 589, 634
Reduzierte Form	373

Tabelle 4.12: Absorptionsmaxima der verschiedenen Redoxzustände der *D. salina* (6-4)-DNA-Photolyase.

Zusätzlich zeigt das Absorptionsspektrum der *D. salina* (6-4)-Photolyase durch Fehlen der Absorptionsmaxima im Bereich von 375 und 410 nm bzw. bei ~ 440 nm deutlich auf, dass in dem DNA-Reparaturenzym lediglich der katalytische FAD-Kofaktor und kein MTHF oder 8-HDF Antennenkofaktor enthalten ist.^[8, 164-166] Der Einbau eines weiteren Flavins als Antennenkofaktor kann ebenfalls aufgrund des zuvor bestimmten Photolyase/ FAD Verhältnisses von $\sim 1:1$ ausgeschlossen werden. Folglich enthält die aufgereinigte *D. salina*

(6-4)-Photolyase genau wie die zuvor rekombinant produzierte und aufgereinigte *A. thaliana* (6-4)-Photolyase keinen Antennenkofaktor.

In den folgenden Experimenten sollte durch Lichtbestrahlung erst der neutrale semichinoide FAD Zustand und anschließend die katalytisch aktive vollständig reduzierte FAD Form erzeugt werden. Dieser lichtgetriebene Reduktionsprozess wird auch als Photoaktivierung bezeichnet.^[87-89]

Die neutrale semichinoide FAD Form der *D. salina* (6-4)-Photolyase konnte unter aeroben Bedingungen nach Belichtung mit Blaulicht ($\lambda_{\text{max}} = 450 \text{ nm}$, 1.45 mW/cm^2), ohne Verwendung eines Reduktionsmittels erhalten werden (Abb. 4.31).

Im Verlauf der blaulichtinduzierten Ausbildung des neutralen semichinoiden FAD Zustandes erhöhten sich die Absorptionsmaxima bei 587 und 631 nm und verbunden mit diesem Effekt verringerten sich die Maxima der oxidierten Form bei 360 nm und 450 nm einschließlich ihrer Feinstruktur. Des Weiteren konnten die Entstehung eines neuen Maximums bei 328 nm, eine geringe Rotverschiebung der Absorptionsmaxima bei 360, 450, 587 und 631 nm um 2 bis 4 nm sowie das Auftreten zweier isosbestischer Punkte bei 324 und 494 nm beobachtet werden (Abb. 4.31, Tab. 4.12).

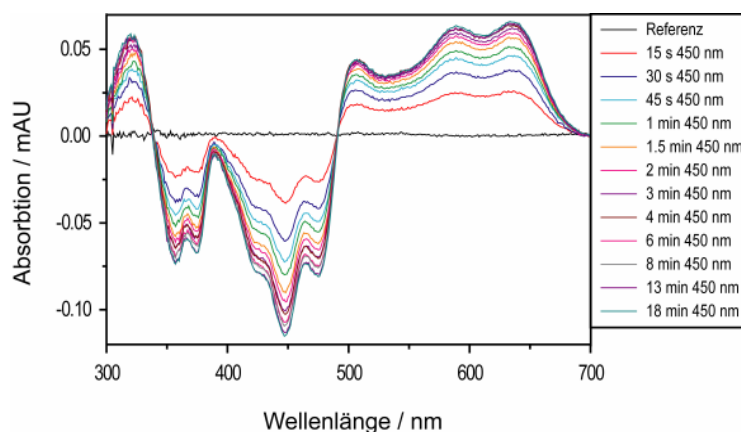


Abbildung 4.31: Differenzspektren der *D. salina* (6-4)-DNA-Photolyase zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung mit Blaulicht ($\lambda_{\text{max}} = 450 \text{ nm}$, 1.45 mW/cm^2). Die *D. salina* (6-4)-Photolyase war in 50 mM Na_2HPO_4 , 2 M NaCl, 10 % Glycerin, pH 7.4 gelöst und die Spektren wurden bei 15 °C aufgenommen.

Der vollständig ausgebildete neutrale semichinoide FAD Zustand der *D. salina* (6-4)-Photolyase wurde nach 18 min mit einer Halbwertszeit von 26 s beobachtet. Die

Halbwertszeit wurde mit einer monoexponentiellen Zerfallsfunktion und ohne Berücksichtigung einer möglichen Rückkonversion in den oxidierten Zustand gefittet.

Belichtung der neutralen semichinoiden FAD-Form der *D. salina* (6-4)-Photolyase mit Weißlicht führt zu einer Abnahme der diesen Zustand repräsentierenden Maxima bei 360, 450, 587 und 631 nm (Abb.4.32). Demnach scheint auch ohne Zusatz eines Reduktionsmittels ein geringer Anteil des in der *D. salina* (6-4)-Photolyase gebundenen FAD vollständig reduziert zu werden. Die Ausbildung der anionischen semichinoiden Form kann in diesem Fall ausgeschlossen werden, da im Bereich von 300 bis 330 nm eine deutliche Absorptionzunahme induziert durch die Bildung der FADH⁻ Form, statt einer Abnahme dieser zu beobachten ist.^[175]

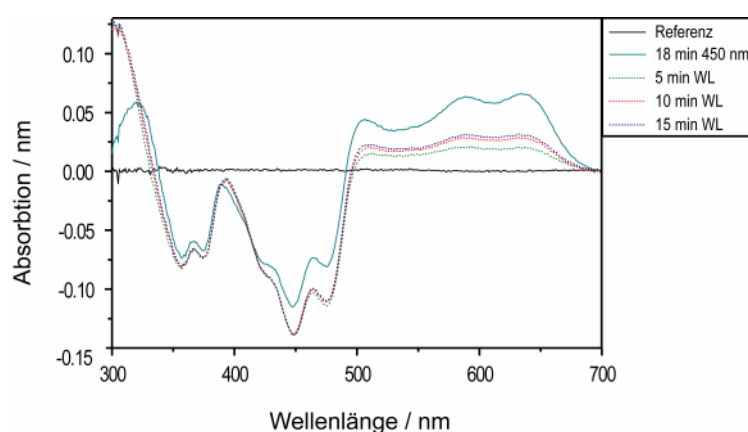


Abbildung 4.32: Differenzspektren der *D. salina* (6-4)-DNA-Photolyase zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung mit Blau- bzw. Weißlicht (Diaprojektor Leitz Prado Universal (Leitz)). Die spektroskopischen Bedingungen sind analog zu Abb. 4.31.

Der so generierte Anteil des in der *D. salina* (6-4)-Photolyase gebundenen vollständig reduzierten FAD ist relativ instabil und oxidiert schon nach fünfminütiger Inkubation im Dunkeln wieder zum neutralen semichinoiden und sogar zum oxidierten Zustand auf. Die Oxidation zeigt für den Ersten einen Anstieg der Absorption im Bereich von 600 nm und für die oxidierte Spezies eine über den neutralen semichinoiden Zustand hinausgehende Absorptionserhöhung bei 450 nm einschließlich der umgebenden Feinstruktur. Hierbei läuft jedoch die Oxidation zur halbreduzierten Form schneller als die Ausbildung des oxidierten Zustandes ab (Abb. 4.33). Nach 50 Minuten akkumulierte die *D. salina* (6-4)-Photolyase eine Mischung aus 17 % oxidierten und 83 % neutraler semichinoider FAD Form.

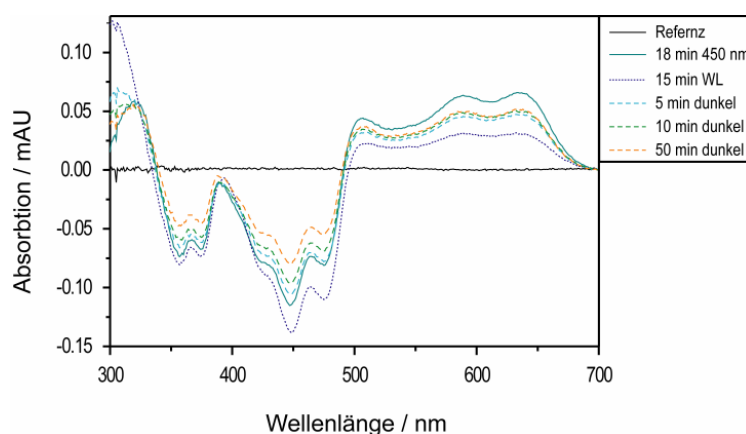


Abbildung 4.33: Differenzspektren der *D. salina* (6-4)-DNA-Photolyase zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung mit Blau- bzw. Weißlicht und nach Dunkeladaption. Die spektroskopischen Bedingungen sind analog zu Abb. 4.31.

Die in Abb. 4.30 gezeigte vollständig reduzierte FAD Spezies der *D. salina* (6-4)-DNA-Photolyase konnte unter aeroben Bedingungen nach Zugabe von 10 mM DTT letztendlich durch Belichtung mit Weißlicht erhalten werden.

Zunächst wurde jedoch ein DTT bedingter Einfluss auf das Differenzspektrum der Photolyase beobachtet (Abb. 4.34). So verringerte sich nach DTT Zugabe, möglicherweise korrelierend mit der geringen Ausbildung des vollständig reduzierten FAD Zustandes, die Absorption im Bereich von 360 und 450 nm. Ein zweites nach fünfminütiger Inkubation der Photolyase im Dunkeln aufgenommenes UV/VIS-Spektrum zeigte keine weitere Veränderung des Differenzspektrums der *D. salina* (6-4)-Photolyase, so dass dieser Effekt keinen Einfluss auf die nachfolgende Photoaktivierung besitzen sollte.

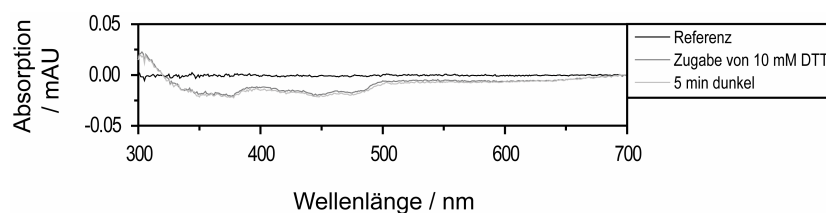


Abbildung 4.34: Differenzspektren der *D. salina* (6-4)-DNA-Photolyase nach Zugabe von 10 mM DTT bzw. 5 min Dunkeladaption. Die spektroskopischen Bedingungen sind analog zu Abb. 4.35, und das Spektrum entsprechend skaliert, um die geringe durch DTT-Zugabe bedingte Veränderung des Differenzspektrums der *D. salina* (6-4)-DNA-Photolyase aufzuzeigen.

Eine zu Beginn durchgeführte Bestrahlung mit Blaulicht ($\lambda_{\text{max}} = 450 \text{ nm}$) führte anfänglich parallel zur vollständigen Reduktion zu einer Zunahme der neutralen semichinoiden FAD-Spezies, welche nach 90 s ihre maximale Konzentration erreichte. Dies kennzeichnet der

Absorptionsanstieg im Bereich von 600 nm. Die Blaulichtbestrahlung resultiert zwar letztendlich in der Reduktion des neutralen semichinoiden Zustandes, lieferte jedoch keine homogen reduzierte *D. salina* (6-4)-DNA-Photolyase (Abb. 4.35). Der Fortschritt der Zweielektronenreduktion war einerseits durch eine Erhöhung der Absorption im Bereich von 300 bis 330 nm und andererseits durch eine Verringerung der Absorption bei 360 und 450 nm einschließlich der Feinstruktur über den semichinoiden Zustand hinaus detektierbar (Vergleich Abb. 4.31).

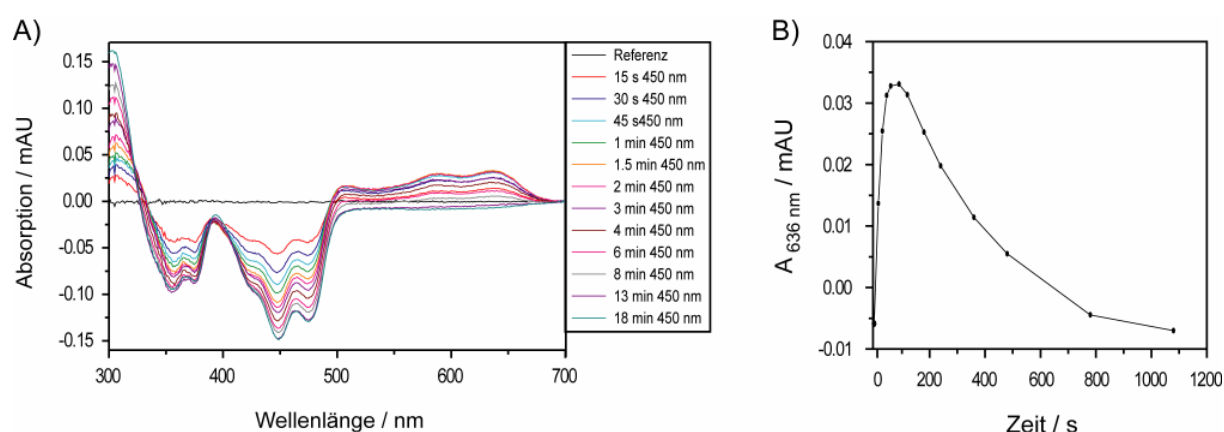


Abbildung 4.35: A) Differenzspektren der *D. salina* (6-4)-DNA-Photolyase zu verschiedenen Zeitpunkten nach Zugabe von 10 mM DTT und Bestrahlung mit Blaulicht ($\lambda_{\text{max}} = 450 \text{ nm}$, 1.45 mW/cm^2). B) Zeitabhängige Darstellung der Absorptionsänderung bei der 636 nm, den neutralen semichinoiden FAD-Zustand repräsentierend. Die *D. salina* (6-4)-Photolyase war in 50 mM Na_2HPO_4 , 2 M NaCl, 10 % Glycerin, pH 7.4 gelöst und die Spektren wurden bei 15 °C aufgenommen.

Die im Anschluss durchgeführte Weißlichtadaptierung der zuvor mit Blaulicht bestrahlten Proteinprobe lieferte bereits nach 10 Minuten die vollständig photoaktivierte *D. salina* (6-4)-DNA-Photolyase (Abb. 4.36). Während der Reduktion mit Weißlicht konnte eine erneute Verringerung aller Absorptionsmaxima der Photolyase beobachtet werden. Diese Verringerung resultiert in einem für die vollständig reduzierte FAD Form typischem UV/VIS-Spektrum mit einem Absorptionsmaximum bei 373 nm (Abb. 4.30, Tab. 4.12).

Die auf diese Weise erhaltene katalytisch aktive Form der *D. salina* (6-4)-Photolyase ist relativ stabil, da nach 10 minütiger Dunkeladaptation der Proteinlösung kein spektroskopisch detektierbares Oxidationsverhalten des Enzyms beobachtet werden konnte (Abb. 4.37).

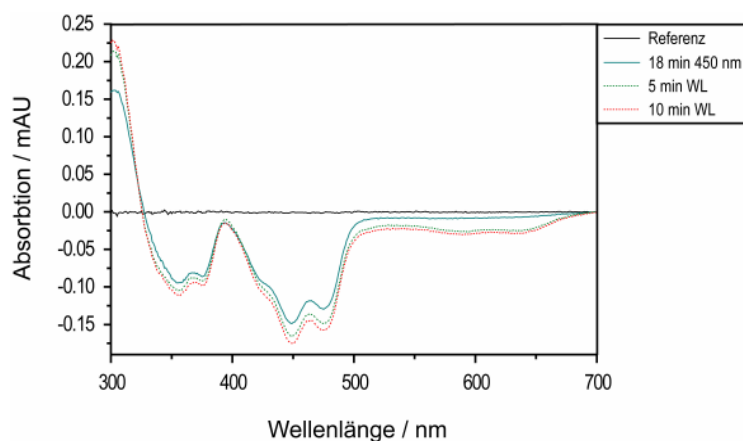


Abbildung 4.36: Differenzspektren der *D. salina* (6-4)-DNA-Photolyase zu verschiedenen Zeitpunkten nach Zugabe von 10 mM DTT und Bestrahlung mit Blau- bzw. Weißlicht (Diaprojektor Leitz Prado Universal (Leitz)). Die spektroskopischen Bedingungen sind analog zu Abb. 4.35.

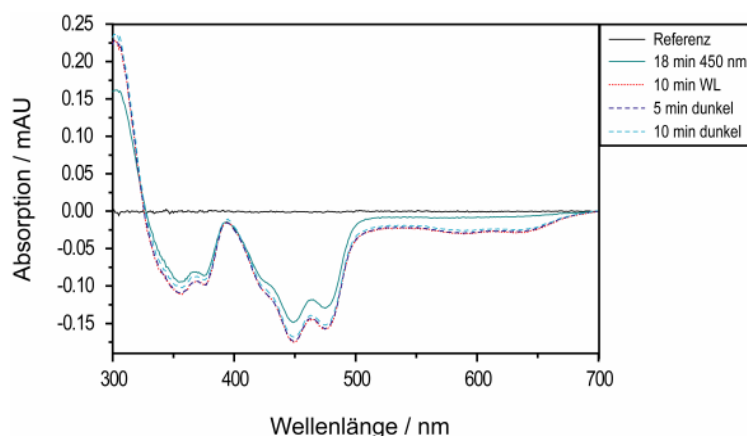


Abbildung 4.37: Differenzspektren der *D. salina* (6-4)-DNA-Photolyase zu verschiedenen Zeitpunkten nach Zugabe von 10 mM DTT, Bestrahlung mit Blau- bzw. Weißlicht und nach Dunkeladaption. Die spektroskopischen Bedingungen sind analog zu Abb. 4.35.

Da trotz mehrtägiger Dunkeladaption auf Eis spektroskopisch nur die zuvor beschriebene Mischform aus oxidiert und neutraler semichinoider *D. salina* (6-4)-Photolyase beobachtet werden konnte, sollte ebenfalls das vollständig oxidierte Enzym hergestellt werden.

Die vollständig oxidierte *D. salina* (6-4)-Photolyase konnte durch Zugabe eines zweifachen Überschusses an Kaliumhexacyanoferrat (III) nach einem Zeitraum von 25 min erhalten werden. Hierbei konvertierte die neutrale semichinoide FAD Form mit einer Halbwertszeit von 2 min 47 s. Während der Oxidation konnte ein Absinken der Absorptionsmaxima bei 587 und 631 nm und, an diesen Effekt gekoppelt, eine Erhöhung der Maxima bei 360 nm und 450 nm einschließlich ihrer Feinstruktur beobachtet werden. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde die

oxidierte *D. salina* (6-4)-DNA-Photolyase vom Kaliumhexacyanoferrat (III) gereinigt und erneut ein Absorptionsspektrum aufgenommen (Abb. 4.30, 4.38, Tab. 4.12).

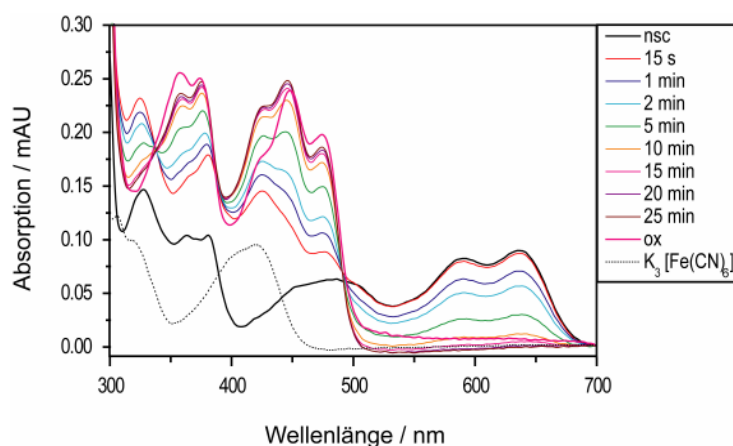


Abbildung 4.38: Absorptionsspektren der *D. salina* (6-4)-DNA-Photolyase zu verschiedenen Zeitpunkten nach Zugabe von $K_3[Fe(CN)_6]$ ausgehend vom neutralen semichinoiden Zustand, und der aufgereinigten Photolyase (pink). Ebenfalls dargestellt ist das Absorptionsspektrum des $K_3[Fe(CN)_6]$ (---). Die *D. salina* (6-4)-Photolyase war in 50 mM Na_2HPO_4 , 2 M NaCl, pH 7.4 gelöst und die Spektren wurden bei 15 °C aufgenommen.

4.3.3. Untersuchung der nativen Faltung und Proteinstabilität der verschiedenen Redoxzustände der *D. salina* (6-4)-Photolyase

Zur Analyse des Faltungsverhaltens und Proteinstabilität der *D. salina* (6-4)-DNA-Photolyase wurden CD-spektroskopische Untersuchungen von ihren drei beobachteten FAD Redoxzuständen durchgeführt. Zu Beginn wurden CD-Spektren der fern-UV Region (260 - 190 nm) aufgenommen, um den Gehalt der Sekundärstrukturelemente und mögliche auftretende Veränderungen dieser ermitteln zu können.

Die fern-UV CD-Spektren der oxidierten und vollständig reduzierten *D. salina* (6-4)-DNA-Photolyase im Bereich von 260 bis 190 nm repräsentieren ein negatives Doppelmaximum bei 220 und 210 nm. Für diese beiden Zustände der *D. salina* (6-4)-Photolyase konnte ein α -Helix/ β -Faltblatt Verhältnis von 95 zu 5 % bestimmt werden. In der halbreduzierten (6-4)-Photolyase hingegen scheinen eine oder mehrere α -helikale Gruppen ungeordnet oder sogar teilweise entfaltet zu sein. Dies verdeutlicht eine Verringerung des Circular dichroismus im Wellenlängenbereich um 220 nm (Abb. 4.39A). Folglich scheinen sich während der Photoaktivierung zunächst im neutralen semichinoiden Zustand der *D. salina* (6-4)-Photolyase einige α -helikale Strukturen partiell zu entfalten, um sich bei weiterer

Belichtung unter Ausbildung des katalytisch, aktiven vollständig reduzierten Zustand wieder neu zu strukturieren. Interessanterweise weist jedoch gerade das fern-CD-Spektrum der halbreduzierten *D. salina* (6-4)-Photolyase die größte Ähnlichkeit zur oxidierten *A. thaliana* (6-4)-Photolyase auf (Abb. 4.39B). Dies deutet an, dass bei der *D. salina* (6-4)-Photolyase während der Photoaktivierung möglicherweise größere strukturelle Änderungen auftreten als im *A. thaliana* Enzym, welches bereits im oxidierten Zustand die partiell ungeordneten α -helikalen Sekundärstrukturelemente aufweist.

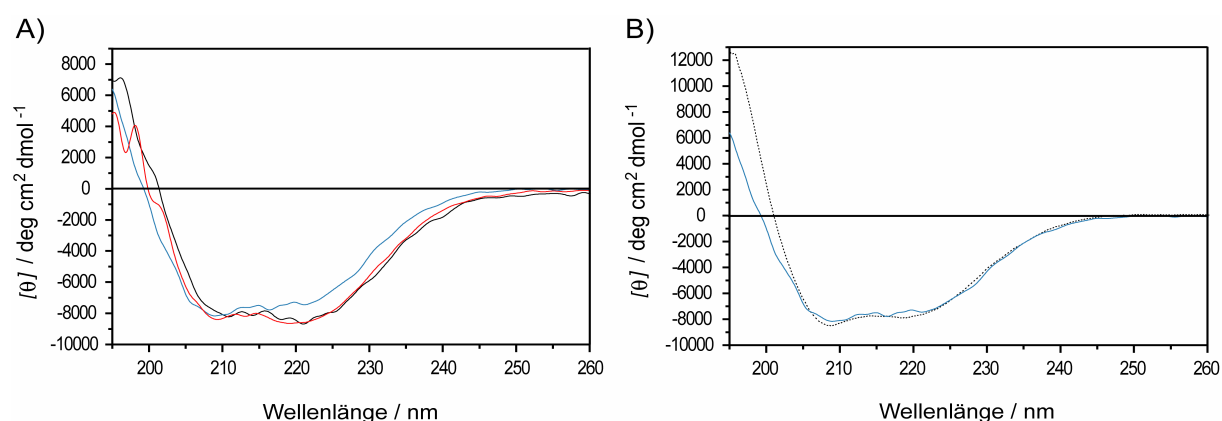


Abbildung 4.39: A) CD-Spektren der *D. salina* (6-4)-DNA-Photolyase in verschiedenen Redoxzuständen und B) Vergleich der neutralen semichinoiden *D. salina* mit der *A. thaliana* (6-4)-DNA-Photolyase. Vollständig oxidierte Form (schwarz), neutrale semichinoide Form (türkis) und vollständig reduzierte Form (rot) der *D. salina* (6-4)-Photolyase. Die *D. salina* (6-4)-Photolyase war in 5 mM Na_2HPO_4 , 200 mM NaCl, 1 % Glycerin, pH 7.4 gelöst, die Spektren wurden bei 5 °C aufgenommen und dreimal akkumuliert. Die *A. thaliana* (6-4)-Photolyase (···) war in 2 mM Tris/HCl, 20 mM NaCl, 1 % Glycerin, pH 7.4 gelöst, die Spektren wurden bei 20 °C aufgenommen und je drei Spektren akkumuliert.

Die bei 207 nm aufgenommenen Schmelzkurven der drei verschiedenen Redoxzustände der *D. salina* (6-4)-Photolyase weisen alle ein kooperatives Denaturierungsverhalten beim Erhitzen auf 95 °C auf. Beim langsamen Abkühlen faltete sich das Enzym nicht wieder in seinen nativen Zustand zurück (Abb. 4.40). Ein Vergleich der Schmelzkurven zeigt, dass sowohl die oxidierte als auch die vollständig reduzierte (6-4)-Photolyase bei 40 °C denaturieren, während das neutrale semichinoide Enzym im Unterschied dazu erst bei 45 °C entfaltet. Ebenfalls auffällig ist, dass die halbreduzierte (6-4)-Photolyase beim Erhitzen auf 95 °C nicht vollständig sowie in einem mehrstufigen Prozess denaturiert. Demnach scheinen einerseits entweder einige C-terminale Bereiche der halbreduzierten *D. salina* (6-4)-Photolyase nichtkooperativ zu entfalten bzw. ein partieller Verlust dieser Kooperativität durch eine starke intrinsische Bindung des FAD-Kofaktors vorzuliegen. Andererseits scheint

dieser halbreduzierte Zustand über Wasserstoffbrückenbindungen oder dipolare Wechselwirkungen, die während der Photoaktivierung ausgebildet werden, geringfügig thermisch stabilisiert zu sein. Diese thermische Stabilisierung könnte die Existenzgrundlage eines recht langlebigen neutralen semichinoiden FAD Zustandes der *D. salina* (6-4)-Photolyase sein, der auch nach längerer Dunkeladaption noch zu beobachtenden ist. Im Gegensatz zum oxidierten und zuvor beschriebenen halbreduzierten Zustand denaturiert die katalytisch aktive, reduzierte *D. salina* (6-4)-Photolyase in einem einstufigen Prozess. Abgesehen von den beobachteten Unterschieden der Redoxzustände untereinander sind die Schmelzpunkte der *D. salina* und der oxidierten *A. thaliana* (6-4)-Photolyase, die bei 43 °C entfaltet, vergleichbar. Demnach scheinen beide Reparaturenzyme ähnlich stabil zu sein (Abschnitt 4.2.3).

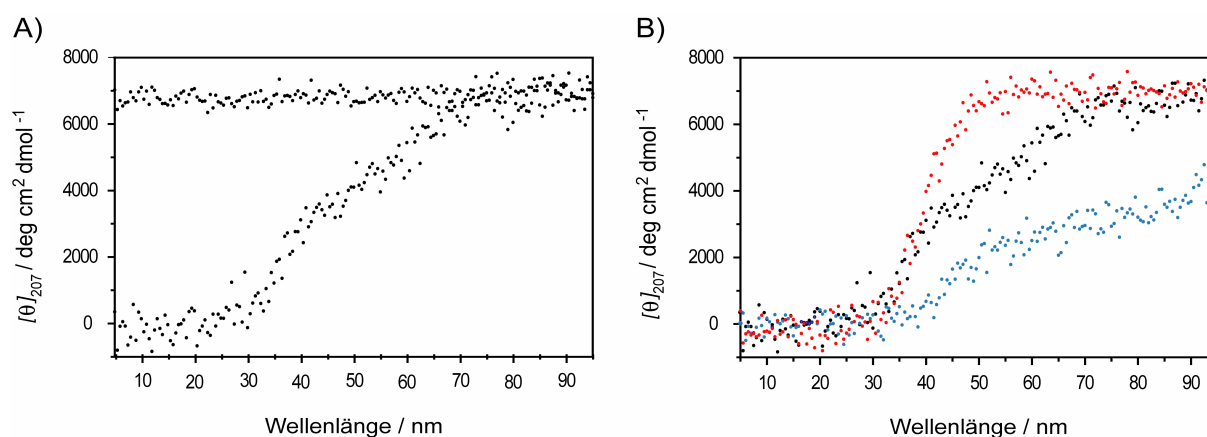


Abbildung 4.40: Schmelzkurven der A) oxidierten B) drei Redoxzustände der *D. salina* (6-4)-DNA-Photolyase. Vollständig oxidierte Form (schwarz), neutrale semichinoide Form (türkis) und vollständig reduzierte Form (rot) der *D. salina* (6-4)-Photolyase. Die *D. salina* (6-4)-Photolyase war in 5 mM Na₂HPO₄, 200 mM NaCl, 1 % Glycerin, pH 7.4 gelöst und die Schmelzkurven wurden von 5 °C bis 95 °C mit 2 °C/ min aufgenommen.

Aufschluss über die durch die Photoaktivierung induzierten Veränderungen in der asymmetrischen Umgebung der aromatischen Aminosäureseitenketten sollten die CD-Spektren der nahen UV-Region (320-240 nm) geben.

Die CD-Spektren der nahen UV-Region der oxidierten und halbreduzierten *D. salina* (6-4)-Photolyase weisen lediglich kleine Unterschiede zueinander im Bereich der Tryptophanfeinstruktur (290 - 305 nm) auf. Die vollständig reduzierte Photolyase zeigt nicht nur im Tryptophanbereich kleine Veränderungen, sondern repräsentiert ebenso einen erhöhten Circular dichroismus korrespondierend zur Phenylalaninfeinstruktur (255 - 270 nm) und zum Adeninanteil des FAD gehörigen Bereich (~ 260 nm) (Abb. 4.41).^[160] Zum einen scheinen

induziert durch reduktionsbedingte strukturelle Änderungen in der (6-4)-Photolyase einige Phenylalaninreste in asymmetrische Umgebungen zu gelangen. Hierbei könnte sich ihre Flexibilität verringern, bzw. sich die asymmetrischen Eigenschaften der Tertiärstruktur in ihrer Umgebung verändern.^[160] Zum anderen scheint sich weißlichtinduziert die strukturelle Umgebung des FAD Adeninanteils zu ändern, so dass dieser im Verlaufe der Photoaktivierung vollständig von der *D. salina* (6-4)-Photolyase umgeben wird. Hierbei könnte der Adeninanteil durch neu geordnete α -helikale Sekundärstrukturelemente stärker umschlossen werden.

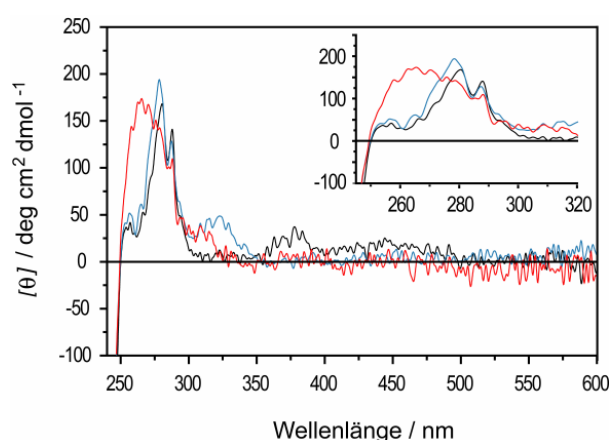


Abbildung 4.41: Nah UV und VIS CD-Spektren der *D. salina* (6-4)-DNA-Photolyase in unterschiedlichen Redoxzuständen. Vollständig oxidierte Form (schwarz), neutrale semichinoide Form (türkis) und vollständig reduzierte Form (rot). Die *D. salina* (6-4)-Photolyase war in 50 mM Na_2HPO_4 , 2 M NaCl, 10 % Glycerin, pH 7.4 gelöst und die Spektren wurden bei 5 °C aufgenommen, zehn Spektren akkumuliert und über neun Punkte nachträglich geglättet.

Abb. 4.41 zeigt ebenfalls den positiven Circular dichroismus der oxidierten *D. salina* (6-4)-DNA-Photolyase im Bereich von 370 und 450 nm. Das durch die asymmetrische FAD-Umgebung induzierte CD-Signal tritt bei denselben Wellenlängen wie die photometrisch bestimmten Absorptionsmaxima der oxidierten Photolyase auf. Für die halb- und vollreduzierte *D. salina* (6-4)-Photolyase konnte erwartungsgemäß keines der beiden CD-Signale beobachtet werden.

4.3.4. Bestimmung der Dissoziationskonstanten

Die DNA-Bindungsexperimente der *D. salina* (6-4)-Photolyase wurden durchgeführt um festzustellen, ob eine Abhängigkeit der Dissoziationskonstanten vom jeweiligen Redoxzustand des Enzyms vorliegt. Hierbei sollten die Dissoziationskonstanten der

unspezifischen Bindung der (6-4)-Photolyase an einzelsträngige bzw. doppelsträngige ungeschädigte DNA bestimmt werden. Zusätzlich sollte das Bindungsverhalten der katalytisch aktiven vollständig reduzierten *D. salina* (6-4)-Photolyase an ein CPD-haltiges doppelsträngiges Oligonukleotid untersucht und das Ergebnis mit den vorherigen Dissoziationskonstanten verglichen werden.

Die Bindungsexperimente wurden mit 2 nM IRD700 markiertem 50-mer Oligonukleotid LAMRA*, welches für doppelsträngige Experimente zuvor hybridisiert wurde, in Gegenwart von verschiedenen Konzentrationen der *D. salina* (6-4)-Photolyase (2 bis 100 bzw. 200 nM) durchgeführt. Die mit dem Odyssey Infrared Imaging System (*LI-COR Biosciences*) aus einem Polyacrylamidgel quantifizierten Intensitäten des ungebundenen Oligonukleotids wurden in prozentuale DNA-Bindung umgerechnet. Die DNA-Bindung wurde in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration mit einer Hill Funktion berechnet und auf diese Art die Dissoziationskonstanten bestimmt. In die Berechnung dieser Dissoziationskonstanten wurde die Abhängigkeit von der Anzahl der gebundenen monomeren *D. salina* (6-4)-Photolyasen mit einbezogen (Abb.4.42 und 4.43).

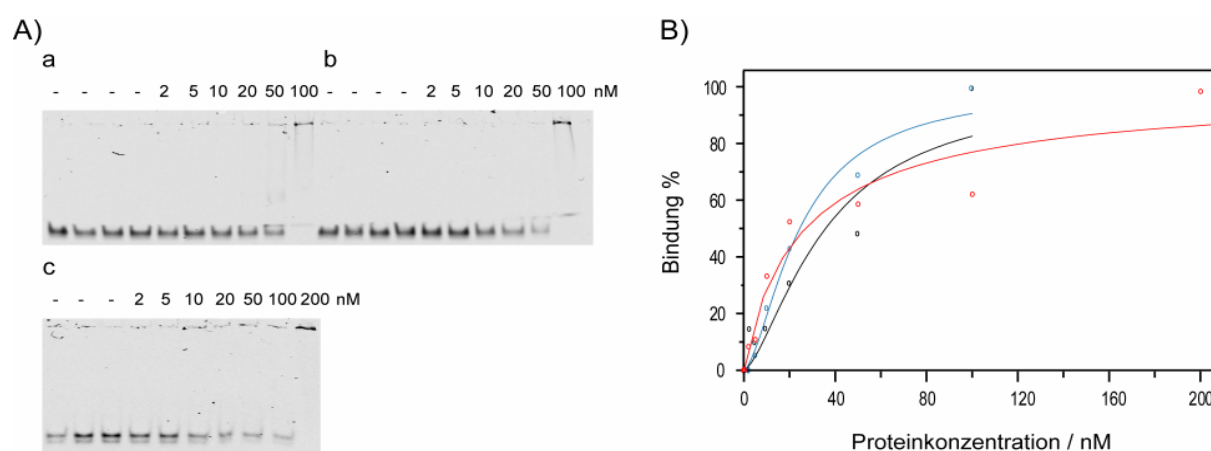


Abbildung 4.42: A) Bindung der *D. salina* (6-4)-DNA-Photolyase in unterschiedlichen Redoxzuständen an ein doppelsträngiges ungeschädigtes 50-mer Oligonukleotid und B) Direkt-lineare Auftragung der DNA-Bindung. Oxidierte (a, Schwarz), neutrale semichinoide (b, türkis) und vollständig reduzierte (c, rot) *D. salina* (6-4)-Photolyase. Das Oligonukleotid (2 nM) wurde mit ansteigenden Konzentrationen der (6-4)-Photolyase gemischt und nach 30 minütiger Inkubation auf ein 6 % Polyacrylamidgel aufgetragen. Der *E-S* Komplex wurde mit der Gelshift-Methode von der ungebundenen DNA getrennt.

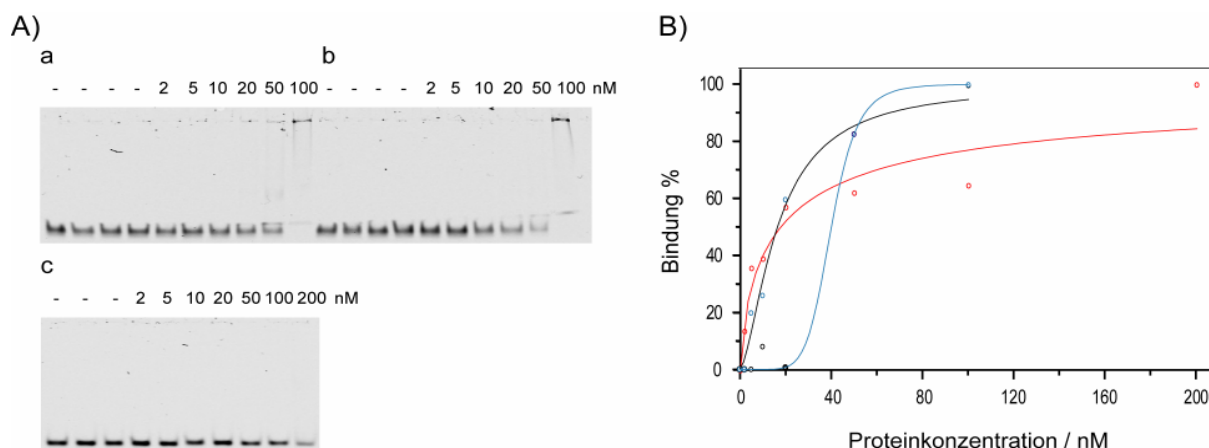


Abbildung 4.43: A) Bindung der *D. salina* (6-4)-DNA-Photolyase in unterschiedlichen Redoxzuständen an ein einzelsträngiges ungeschädigtes 50-mer Oligonukleotid und B) Direktlineare Auftragung der DNA-Bindung. Oxidierte (a, Schwarz), neutrale semichinoide (b, türkis) und vollständig reduzierte (c, rot) *D. salina* (6-4)-Photolyase. Das Oligonukleotid (2 nM) wurde mit ansteigenden Konzentrationen der (6-4)-Photolyase gemischt und nach 30 minütiger Inkubation auf ein 6 % Polyacrylamidgel aufgetragen. Der E-S Komplex wurde mit der Gelshift-Methode von der ungebundenen DNA getrennt.

Die in den Tabellen 4.13 und 4.14 aufgeführten Dissoziationskonstanten der *D. salina* (6-4)-Photolyase zeigen, dass die neutrale semichinoide bzw. die vollständig reduzierte Photolyase eine höhere Affinität sowohl zur doppel- als auch einzelsträngigen ungeschädigten DNA aufweist. Das oxidierte Enzym hingegen besitzt eine um den Faktor 1.5 bzw. 2.1 erhöhte Dissoziationskonstante. Demnach zeigt die photoaktivierte *D. salina* (6-4)-Photolyase wie erwartet etwas eine erleichterte Bindung an ungeschädigte DNA. Interessanterweise scheint die (6-4)-Photolyase in ihrem neutralen semichinoiden und vollständig reduzierten Zustand eine leicht höhere Affinität zu einzelsträngiger DNA zu besitzen. Dies zeigen die um den Faktor von 1.25 verringerten Dissoziationskonstanten dieser beiden Zustände im Vergleich zur oxidierten Photolyase. Ebenso weist das *D. salina* Enzym in seiner vollständig reduzierten Form eine um 50 % verringerte Affinität zu CPD-haltiger doppelsträngiger DNA auf. Unter Verwendung von einzelsträngiger DNA konnte dieser Effekt jedoch nicht beobachtet werden.

<i>D. salina</i> (6-4)-Photolyase	ds DNA	ss DNA
oxidierte Form	$K_d = 35.9 \text{ nM} \pm 7.6 \text{ nM}$ $n = 1.5 \pm 0.4$	$K_d = 37.9 \text{ nM} \pm 0.7 \text{ nM}$ $n = 5.4 \pm 0.4$
neutrale semichinoide Form	$K_d = 24.5 \text{ nM} \pm 2.6 \text{ nM}$ $n = 1.6 \pm 0.2$	$K_d = 18.5 \text{ nM} \pm 2.4 \text{ nM}$ $n = 1.9 \pm 0.4$
reduzierte Form	$K_d = 26.9 \text{ nM} \pm 5.6 \text{ nM}$ $n = 0.9 \pm 0.2$	$K_d = 17.7 \text{ nM} \pm 4.3 \text{ nM}$ $n = 0.7 \pm 0.1$

Tabelle 4.13: Dissoziationskonstanten der unspezifischen Bindung der *D. salina* (6-4)-DNA-Photolyase in unterschiedlichen Redoxzuständen an doppelsträngige und einzelsträngige ungeschädigte 50-mer Oligonukleotide. Die zu den ermittelten Bindungskurven gehörenden DNA-Bindungskurven sind in Abb. 4.42B und 4.43B dargestellt.

Reduzierte <i>D. salina</i> (6-4)-Photolyase	CPD-DNA
ds Oligo	$K_d = 50.58 \text{ nM} \pm 7.3 \text{ nM}$ $n = 1.3 \pm 0.2$
ss Oligo	$K_d = 13.4 \text{ nM} \pm 1.3 \text{ nM}$ $n = 1.5 \pm 0.2$

Tabelle 4.14: Dissoziationskonstanten der Bindung der vollständig reduzierten katalytisch aktiven *D. salina* (6-4)-DNA-Photolyase an ein doppelsträngiges bzw. einzelsträngiges CPD-haltiges 50-mer Oligonukleotid.

Des Weiteren konnte wie schon zuvor für das *A. thaliana* Enzym gezeigt werden, dass mehrere *D. salina* (6-4)-Photolyasen an ein 50-mer Oligonukleotid binden können. Dieser Effekt, der bevorzugt für die Bindung der oxidierten *D. salina* (6-4)-Photolyase an einzelsträngige ungeschädigte DNA beobachtet wurde, ist konsistent mit DNase I Footprint Experimenten und dem in den Kristallstrukturen der (6-4)-und CPD-Photolyasen im Komplex mit geschädigten Oligonukleotiden beobachteten DNA-Bindungsverhalten.^[75, 103, 104]

Die unspezifischen für die Bindung der *D. salina* (6-4)-Photolyase an doppelsträngige DNA ermittelten Dissoziationskonstanten liegen in der selben Größenordnung wie die zuvor für die *A. thaliana* (6-4)-Photolyase (25.0 bzw. 61.5 nM) bestimmten Werte.

Die erhaltenen Dissoziationskonstanten im nanomolaren Bereich können somit als Erklärung für den hohen DNA-Gehalt der *D. salina* (6-4)-Photolyase nach dem Zellaufschluss dienen, der zur Folge hatte, dass die gebundene DNA während der Aufreinigung vom Enzym entfernt werden musste.

5. Diskussion

5.1. Konversion und Analyse der photochemischen Eigenschaften der *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domäne

Die BLUF-Domäne aus *E. coli* YcgF besitzt im Vergleich zu anderen bereits charakterisierten BLUF-Domänen enthaltenden Proteinen einige photochemische Besonderheiten. Zu diesen Besonderheiten zählen ein im dunkel-, sowie lichtadaptiertem Zustand beobachtetes blauverschobenes Absorptionsmaximum bei 461 bzw. 465 nm, eine kleinere blaulichtinduzierte Rotverschiebung, ein stark stabiler Signalzustand und ein charakteristischer Triplettzustand des Flavinchromophors. Lediglich für die AppA BLUF-Domäne konnte ein ähnlich stabiler lichtadaptierter Zustand, mit einer Halbwertszeit von 15 min beobachtet werden (Abschnitt 1.2.3; Tab. 1.1).^[19-23, 29, 45, 47, 52, 176] Daher lassen sich die BLUF-Domänen enthaltenden Proteine aufgrund ihrer photochemischen Eigenschaften in zwei Subtypen unterteilen: Hierbei repräsentieren die alleinstehenden BLUF-Domänen enthaltenden Proteine SyPixD, TePixD und BlrB, sowie BlrP1 und AppA den Subtyp I und YcgF den Subtyp II. Zusätzlich kann der Subtyp I begründet durch die unterschiedliche Stabilität des Signalzustandes in den Typ A (z.B. SyPixD) und Typ B (AppA) unterteilt werden.

Zur rationalen Konversion der photochemischen Eigenschaften des YcgF-Subtyp II in den SyPixD-Subtyp I wurden Oberflächenmutanten von der *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domäne hergestellt und diese unter Verwendung biophysikalischer Methoden untersucht. Die erhaltenen Resultate dieser *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domänenmutanten werden nachfolgend zunächst sowohl mit dem Wildtyp als auch mit zuvor untersuchten BLUF-Domänen verglichen (Abb. 5.2). Hierbei werden vor allem die sensorischen Eigenschaften, die Proteinstabilität, die lichtinduzierte Rotverschiebung und die Stabilität des Signalzustandes betrachtet. In weiteren Schritten soll der Einfluss der in der *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domäne ausgetauschten Aminosäuren auf den Photozyklus, die für die Signalweiterleitung benötigten lichtinduzierten strukturellen Veränderungen und die funktionellen Eigenschaften der BLUF-Domäne als möglicher Temperatursensor diskutiert werden.

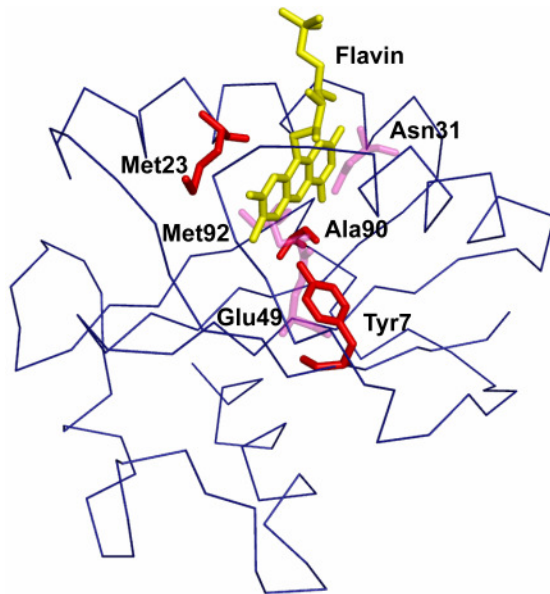


Abbildung 5.1: Bändermodell der *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domäne. Das 3D-Modell wurde anhand der *R. sphaeroides* BlrB Kristallstruktur (PDB ID: 2bycB) mit dem Server SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) im *First Approach Mode* generiert.^[158] Dargestellt sind die ausgetauschten nativen Aminosäurereste (rot), weitere am Photozyklus und der Signalweiterleitung beteiligte Aminosäuren (pink), sowie der FMN-Chromophor (gelb) des *E. coli* YcgF-(1-137).

5.1.1. Allgemeine Eigenschaften der verschiedenen *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domänen

Die *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domänenmutanten Y7F, M23I, M23L, A90W und M23I_A90W konnten ähnlich dem Wildtyp homogen mit dem FMN-Chromophor rekonstituiert werden. Folglich sind die ausgetauschten Aminosäurereste nicht direkt an der Bindung des Flavinchromophors beteiligt (Abb. 5.1). Auch die publizierten Strukturen der SyPixD, TePixD, BlrB, BlrP1 und AppA BLUF-Domänen zeigten für das Tyrosin 7 und den in diesen Photorezeptoren anstelle des Alanin 90 vorkommenden Tryptophan- bzw. Threoninresten keine direkte Beteiligung an der Flavinkinbindung.^[21, 23, 25-27] Des Weiteren konnte keine durch den Austausch der Aminosäuren bedingte Stabilitätsverringerng der YcgF-(1-137) BLUF-Domäne beobachtet werden. Daher kann ausgeschlossen werden, dass die nativen Aminosäuren an besonders stabilisierenden Wasserstoffbrücken oder hydrophoben Wechselwirkungen beteiligt sind.

Jedoch wurde eine mutationsbedingte Veränderung des Oligomerisierungszustandes der *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domäne vom dimeren zum monomeren Zustand beobachtet. Dies überrascht, da die mutierten Aminosäuren die Eigenschaften des YcgF-(1-137) in Richtung der SyPixD, TePixD und AppA BLUF-Domänen verändern sollten. Demnach wurde für die *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domänenmutanten M23I, M23L, A90W und M23I_A90W eigentlich ein Vorliegen des dimeren oder sogar pentameren Zustands erwartet.^[19, 25-27, 30] Auch wurde für die AppA Y21F Mutante nicht die für die entsprechende *E. coli* YcgF-(1-137)_Y7F beobachtete Veränderung des dimeren Oligomerisierungszustands

gezeigt.^[30] Die Änderung des oligomeren Zustands der YcgF BLUF-Domänenmutanten wird demnach möglicherweise durch fehlende im Wildtyp auftretende Wechselwirkungen, die durch den Austausch des Tyrosin 7, Methionin 23 und Alanin 90 gestört oder entfernt wurden, verursacht. Im Fall der Tyrosinmutante konnte z.B. anhand eines mehrstufigen Denaturierungsprozesses festgestellt werden, dass der eingefügte Phenylalaninrest entweder das Entfaltungsverhalten einiger isolierter α -helikaler Bereiche beeinflusst oder die Protein-FMN-Interaktionen zu verändern scheint. Hinzu kommt, dass - wie im Wildtyp - die in den YcgF-(1-137) BLUF-Domänenmutanten enthaltene C-terminale J α -Helix sterisch mit der Ausbildung höherer Oligomerisierungszustände interferieren könnte, indem sie - ähnlich dem BlrB - eine hydrophobe Grenzfläche verdeckt.^[45, 177]

5.1.2. Einfluss der mutierten Aminosäurereste auf die photochemischen Eigenschaften der *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domäne

Der in allen BLUF-Photorezeptoren konservierte Tyrosinrest ist auch im *E. coli* YcgF für die Schaltung der BLUF-Domäne essentiell. Dies konnte anhand einer *E. coli* YcgF-(1-137)_Y7F Mutante gezeigt werden, die nicht in der Lage war bei Raumtemperatur die blaublichtinduzierte Rotverschiebung aufzuzeigen. Diese Rotverschiebung präsentiert im BLUF-Photozyklus den ausgebildeten Signalzustand.^[22] In Kombination mit den vorhandenen publizierten Strukturen der SyPixD, TePixD, BlrB und AppA BLUF-Domänen weisen diese Resultate auf eine Beteiligung des konservierten Tyrosinrestes an der blaublichtinduzierten Generierung des Signalzustandes hin.^[30, 36, 177-180] Während der Ausbildung des Signalzustandes kann also auch im bakteriellen Blaublichtrezeptor das Tyrosin 7, analog zu den anderen BLUF-Domänen, als Elektronendonator für das Flavin und als Protonendonator für das Glutamin 49 agieren und ist an der Ausbildung des FADH[•]-Tyr7[•]-Radikalpaares, sowie an Wasserstoffbrückenneuordnungen beteiligt.^[15, 34-36, 181, 182]

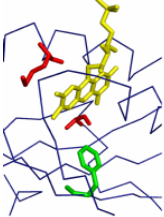
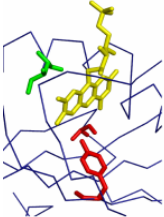
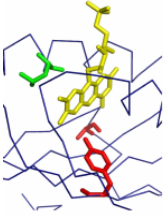
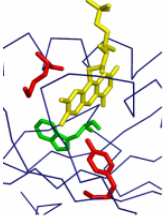
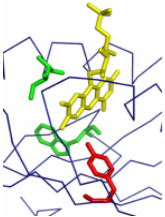
	Effekt der Mutation	Funktion der nativen bzw. eingefügten AS
<p>Y7F</p> 	<ul style="list-style-type: none"> - Keine lichtinduzierte Rotverschiebung - Veränderter Flavin-Triplettzustand - Stabilisierung des neutralen semichinoiden FMN-Zustands 	<p>Y7 - Beteiligung am Elektronen- und Protonentransfer</p> <ul style="list-style-type: none"> - Ausbildung der FAD -Tyr -Radikalpaares - Beteiligung an der Neuordnung des Wasserstoffbrückennetzwerks
<p>M23I</p> 	<ul style="list-style-type: none"> - Blauverschobener Signalzustand - Erhöhung der Aktivierungsenergie der Dunkelreversion - Beschleunigte Dunkelreversion - Veränderter Flavin-Triplettzustand 	<p>M23 - Interaktion mit dem Isoalloxazinring im Dunkel- und im Triplettzustand</p> <ul style="list-style-type: none"> - Stabilisierung des Signalzustandes - Beteiligung an strukturellen Änderungen und der Signalweiterleitung <p>I23 - Beteiligung an strukturellen Änderungen und der Signalweiterleitung</p>
<p>M23L</p> 	<ul style="list-style-type: none"> - Blauverschobener Signalzustand - Erhöhung der Aktivierungsenergie der Dunkelreversion - Beschleunigte Dunkelreversion - Veränderter Flavin-Triplettzustand 	<p>M23 - siehe M23I Mutante</p> <p>L23 - Beteiligung an strukturellen Änderungen und der Signalweiterleitung</p>
<p>A90W</p> 	<ul style="list-style-type: none"> - Blauverschobener Signalzustand - Beschleunigte Dunkelreversion - Veränderter Flavin-Triplettzustand 	<p>W90 - Interaktion mit dem Flavinisoxalloxazinring im Dunkel- und im Triplettzustand</p> <ul style="list-style-type: none"> - Lichtinduzierte Konformationsänderung - Destabilisierung des Signalzustands - Beschleunigung der Rückkonversion nach Überwindung der Aktivierungsenergie - Beteiligung an strukturellen Änderungen und der Signalweiterleitung
<p>M23I_A90W</p> 	<ul style="list-style-type: none"> - Blauverschobener Signalzustand - Erhöhung der Aktivierungsenergie der Dunkelreversion - Extrem stark beschleunigte Dunkelreversion - Veränderter Flavin-Triplettzustand 	<p>M23 - Siehe M23I Mutante</p> <p>W90 - Siehe A90W Mutante</p>

Abbildung 5.2: Zusammenfassung der beobachteten Charakteristika der verschiedenen *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domänenmutanten und Beschreibung der möglichen Funktionen der nativen bzw. der eingefügten Aminosäurereste. In den Modellen der YcgF-(1-137) BLUF-Domäne sind die jeweils eingefügten Mutationen in grün und die jeweils unveränderten Aminosäurereste in rot dargestellt.

Zusätzlich zum eingefrorenen Photozyklus besaß die Y7F Mutante im dunkeladaptierten Zustand ein im Vergleich zur nativen *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domäne blauverschobenes

UV/VIS-Absorptionsspektrum. Eine analoge Blauverschiebung wurde ebenso für die AppA_Y21F Mutante veröffentlicht.^[6] Des Weiteren wurde für die *E. coli* YcgF-(1-137)_Y7F BLUF-Domäne, ähnlich den Tyrosin- und Glutaminmutanten der TePixD BLUF-Domäne, ein zum Teil stabilisierter neutraler semichinoider FMN-Zustand beobachtet.^[180] Diese neutrale semichinoide FMN-Form der YcgF-(1-137)_Y7F BLUF-Domäne wurde jedoch im Gegensatz zu den TePixD Mutanten auch noch nach mehrstündiger Dunkeladaption beobachtet. Demnach könnte die *E. coli* YcgF-(1-137)_Y7F Mutante ein Intermediat darstellen, das scheinbar zwischen dem dunkeladaptiertem Zustand und der Ausbildung des Radikalpaars festhängt.

Diese beschriebene lichtinduzierte Reduktion des Chromophors setzt ihrerseits, wie die Cys-Addukt-Ausbildung im Signalzustand der LOV-Domänen, die zwischenzeitliche Ausbildung eines Flavin-Triplettzustand voraus.^[178] Dieser Triplettzustand konnte für die native *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domäne und für ihre Y7F-Mutante, ausgehend vom dunkeladaptiertem Photorezeptor, nachgewiesen werden. Der Triplettzustand der nativen bakteriellen BLUF-Domäne besitzt ein asymmetrisches tr-EPR-Signal bestehend aus zwei äußeren und zwei inneren Peaks. Ein Vergleich des tr-EPR-Signal des nativen *E. coli* BLUF-Photorezeptors mit der Y7F Mutante zeigt in ersten Simulationen jedoch definierte Unterschiede. Demnach scheint das Tyrosin 7 aufgrund seiner Nähe zum Isoalloxazinring einen Einfluss auf das tr-EPR-Signal des Flavin-Triplettzustands zu besitzen.

Im Unterschied dazu scheint die *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domäne zunächst sehr tolerant gegenüber Veränderungen an den Positionen des Methionin 23 und Alanin 90 zu sein. Die generierten Methionin- und Alaninmutanten der *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domäne waren in der Lage, den Photozyklus zu durchlaufen und zeigten die für den Signalzustand charakteristische Rotverschiebung. Die beobachtete Rotverschiebung war zwar ebenso gering wie bei der nativen BLUF-Domäne, jedoch beeinflussten die an diesen Positionen eingefügten Mutationen die Umgebung des Flavins, so dass beide Absorptionsmaxima sowohl im dunkel- als auch im lichtadaptiertem Zustand blauverschoben waren. Daher lieferten jeweils die M23I, M23L und A90W Einzelmutationen bzw. die M23I_A90W-Doppelmutation einen Signalzustand, der ähnliche Absorptionsmaxima wie die SyPixD, BlrB, BlrP1 und AppA BLUF-Domänen aufweist.^[19, 21, 23, 30] Dieser Effekt konnte bevorzugt für die Methioninmutanten beobachtet werden, andeutend, dass das Methionin an der Ausbildung des Signalzustandes beteiligt und somit hauptsächlich für die charakteristischen photochemischen Eigenschaften der nativen YcgF-(1-137) BLUF-Domänen verantwortlich ist. Darüber hinaus

konnte einerseits ein stabilisierender Einfluss des Methioninrestes 23 auf den Signalzustand, möglicherweise durch von ihm getriggerte globale, strukturelle Änderungen beobachtet werden. Andererseits führt der Einbau des Tryptophan in beiden A90W Mutanten zu einer Destabilisierung des Signalzustandes und fördert die Rückkonversion. Beide Effekte verdeutlichen eine Beschleunigung der Licht-Dunkel-Konversion zunehmend von der M23L über die M23I und A90W Einzelmутanten bis zur M23I_A90W Doppelmutante der *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domäne. Im Vergleich zum Wildtyp konnte für die Doppelmutante bei 19 °C sogar eine Halbwertszeit von 8 s detektiert werden. Somit besitzt die *E. coli* YcgF-(1-137)_M23I_A90W BLUF-Domäne, aufgrund beider Mutationen, zum Teil die photochemischen Eigenschaften der alleinstehenden SyPixD, TePixD und BlrB BLUF-Photorezeptoren.^[19-21] Interessanterweise präsentierte die blaulichtsensitive W91A Mutante des SyPixD ebenso eine beschleunigte Licht-Dunkel-Konversion und keine Stabilisierung des Signalzustandes der alleinstehenden BLUF-Domäne.^[49] Dieser Vergleich zeigt auf, dass die untersuchten Methionin- und Alaninreste zwar für einen Großteil der photochemischen Besonderheiten der *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domäne jedoch nicht für alle verantwortlich sind.

Wie zuvor am Beispiel der *E. coli* YcgF-(1-137)_Y7F BLUF-Domänenmutante besprochen, setzt die Reduktion des Flavinchromophors die Ausbildung eines Tripletzustandes voraus.^[178] Auch wurde am Beispiel der AppA BLUF-Domäne die Ausbildung eines lichtinduzierten Tripletzustandes im Verlauf des Photozyklus prognostiziert.^[20, 36] Dieser Tripletzustand konnte, neben der nativen und der YcgF-(1-137)_Y7F BLUF-Domäne, auch für die Methionin- und Alanin Oberflächenmutanten ausgehend vom dunkeladaptiertem Photorezeptor generiert werden. Die tr-EPR-Spektren zeigten, dass das asymmetrische Signal der nativen bakteriellen BLUF-Domäne durch Wechselwirkungen des Methionin 23 mit dem Flavinisalloxazinring beeinflusst wird. Der Einfluss des Methioninrestes auf das EPR-Signal des Flavins konnte hierbei durch alle drei Methioninmutanten bestätigt werden, die eher ein einfacheres für ungebundenes, gelöstes FMN typisches EPR-Signal repräsentierten.^[154, 155] Ebenso weist das für alle *E. coli* YcgF-(1-137) Methioninmutanten erhaltene tr-EPR-Signal nun deutlich mehr Ähnlichkeit sowohl zur SyPixD als auch zur AppA-BLUF-Domäne und sogar zu den LOV-Domänen auf (Abb. 5.3).^[176] Daher scheint dieser Methioninrest nicht nur den Signalzustand der YcgF-(1-137) BLUF-Domäne zu stabilisieren, sondern auch im Dunkelzustand in der Nähe des Flavinisalloxazinrings lokalisiert zu sein. Aufgrund dieser räumlichen Nähe ist das Methionin 23 in der Lage, in dem durch *Intersystem Crossing*

ausgebildeten Triplettzustand eventuell über sein Schwefelatom mit dem Flavinisoalloxazinring zu wechselwirken.

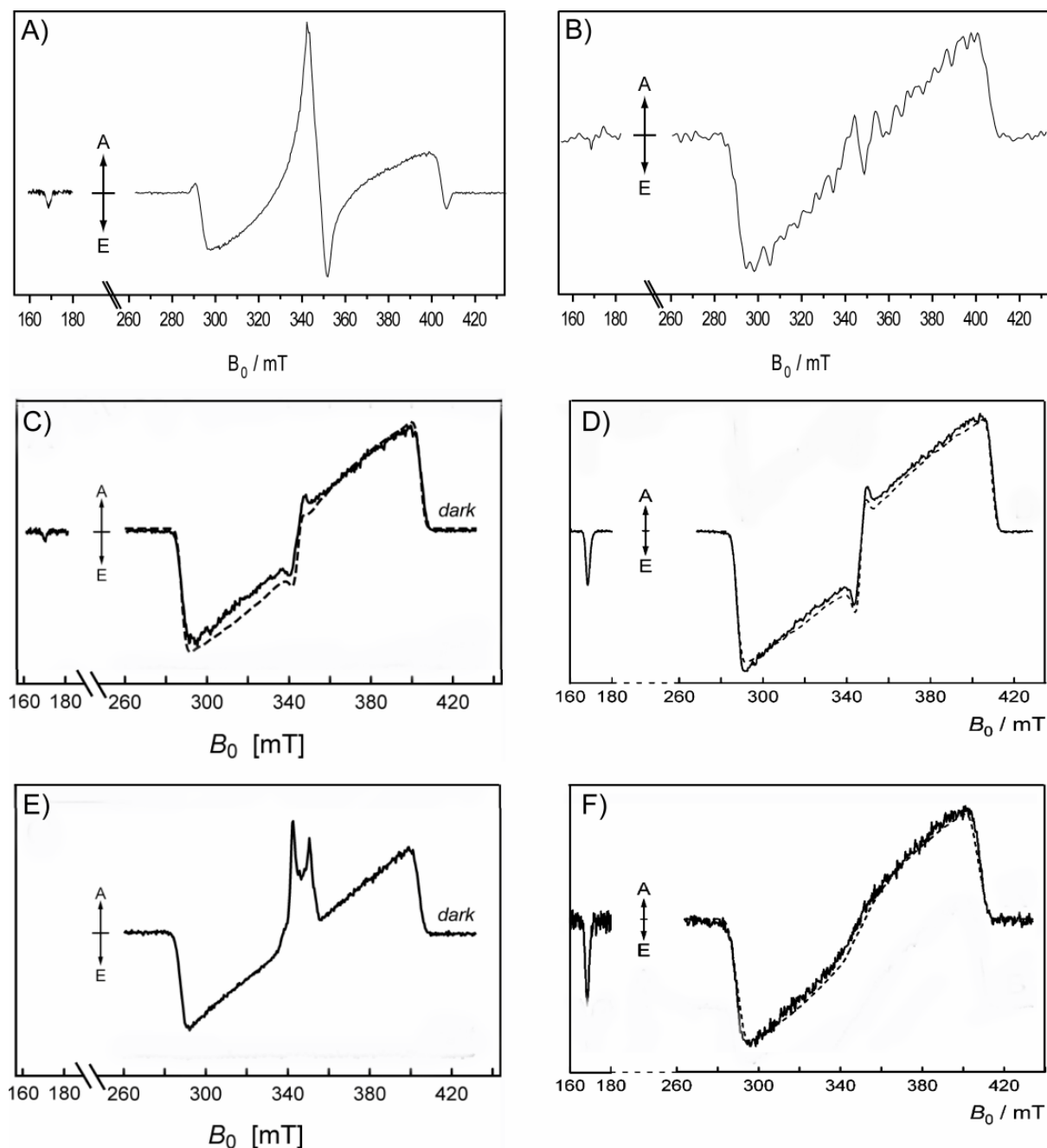


Abbildung 5.3: Vergleich verschiedener EPR-Spektren. A) *E. coli* YcgF-(1-137), B) *E. coli* YcgF-(1-137)_M23I, C) *R. sphaeroides* AppA, D) *A. sativa* LOV2, E) *Synechocystis* sp. SyPixD und F) FMN-Lösung.^[154, 155, 176]

Zusätzlich konnte eine Beteiligung des durch Mutation an der Alanin 90 Position eingefügten Tryptophanrestes an der Ausbildung des Triplettzustandes beobachtet werden. Dies konnte hauptsächlich in der YcgF-(1-137)_A90W BLUF-Domäne durch ein verändertes EPR-Signal

im Vergleich zum Wildtyp detektiert werden. Daher kann davon ausgegangen werden, dass sich der eingefügte Tryptophanrest in der dunkeladaptierten YcgF-BLUF-Domäne in der W_{in} Konformation befindet. Für die lichtadaptierte A90W-Mutante hingegen konnte CD-spektroskopisch für das einzige in dieser Oberflächenmutante enthaltene Tryptophan 90 keine durch die Tertiärstruktur der BLUF-Domäne bedingte asymmetrische Umgebung des nachgewiesen werden, so dass der Tryptophanrest hier womöglich in der W_{out} Konformation vorliegt (Abb. 5.4). Folglich kann angenommen werden, dass der in der *E. coli* YcgF-(1-137)_A90W BLUF-Domäne anstelle des Alanins eingefügte Tryptophanrest lichtinduziert im Verlauf des Photozyklus einen Wechsel von der inwärts W_{in} in die auswärts W_{out} Konformation, wie für die AppA BLUF-Domäne beschrieben, vornimmt.^[25] Hierbei könnte der eingefügte Tryptophanrest im W_{in} -Zustand zum konservierten Glutaminrest 49 eine Wasserstoffbrücke ausbilden.^[25, 41, 43]

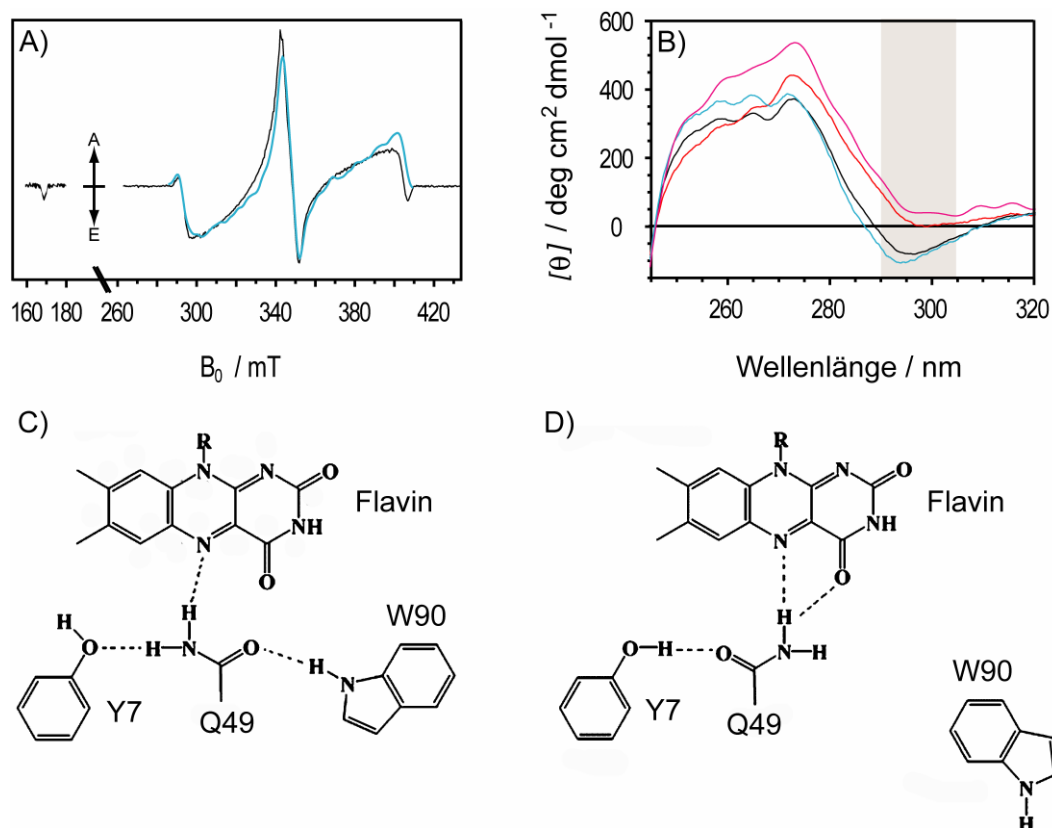


Abbildung 5.4: A) EPR-Spektren und B) nah-UV CD-Spektren verschiedener *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domänen. YcgF-(1-137) (schwarz), YcgF-(1-137)_M23I (rot), YcgF-(1-137)_A90W (hellblau) und YcgF-(1-137)_M23I_A90W (pink). Das von der dunkeladaptierten YcgF-(1-137)_M23I_A90W aufgenommene tr-EPR-Spektrum repräsentiert die W_{in} - C) und das CD-Spektrum des lichtadaptierten Zustands die W_{out} -Konformation D) des eingefügten Tryptophan 90.

5.1.3. Die Temperatursensitivität der verschiedenen *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domänen

Die native *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domäne präsentierte neben ihrer photochemischen Aktivität eine zusätzliche Temperaturabhängigkeit der Dunkelreversion des Signalzustandes, andeutend, dass der bakterielle Rezeptor sowohl die Eigenschaften eines Blaulicht- als auch eines Temperatursensors besitzt. Die Oberflächenmutanten der *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domäne zeigten analog zum Wildtyp eine Temperaturabhängigkeit der Zerfallsraten des lichtadaptierten Zustandes. Diese Temperaturabhängigkeit wird in der nativen BLUF-Domäne durch die globalen strukturellen Änderungen zwischen den licht- und dunkeladaptierten Zuständen bedingt.^[9] An diesen lichtinduzierten strukturellen Änderungen und somit an der Signalweiterleitung über die C-terminale J α -Helix scheint der Methioninrest 23 beteiligt zu sein. Dies konnte durch um bis zu 21 % erhöhte Aktivierungsenergien im Falle der Methionin-Einzelmutanten verdeutlicht werden. Hierbei scheinen zwar das eingefügte Isoleucin und Leucin an den lichtinduzierten strukturellen Veränderungen teilzuhaben, die Rückkonversion dieser Änderungen aber durch störende Wechselwirkungen eventuell im Wasserstoffbrückennetzwerk zu beeinflussen. Zusätzlich scheint das eingefügte Isoleucin im Gegensatz zum nativen Methionin 23 den Wechsel des eingefügten Tryptophanrestes von der W_{out} in die W_{in} Konformation zu behindern. Dies konnte im Vergleich zur nativen *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domäne anhand einer ähnlichen Aktivierungsenergie der A90W Mutante, sowie einer um 28 % erhöhte Aktivierungsenergie der Doppelmutante gezeigt werden (Abb. 5.5). Des Weiteren ist die beobachtete Aktivierungsenergie der *E. coli* YcgF-(1-137)_M23I_A90W BLUF-Domäne fast doppelt so hoch, wie der für die TePixD BLUF-Domäne erhaltene Wert ($\Delta E_A = 81 \text{ kJ/mol}$),^[20] so dass die Dunkelreversionen und die Signalübertragung trotz ähnlicher Halbwertzeiten beider Blaulichtrezeptoren über unterschiedliche strukturelle Mechanismen abzulaufen scheinen.

Zusammenfassend kann für die *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domäne eine durch das Einfügen des Isoleucin- und Tryptophanrestes bedingte rationale Veränderung einiger photochemischer Charakteristika beobachtet werden. Zu diesen photochemischen Eigenschaften gehören die blauverschobenen Absorptionsmaxima des Signalzustandes, die beschleunigte Licht-Dunkel-Konversion, die Flavintriplettzustände und die lichtinduzierte Konformationsänderung des Tryptophans. Diese beobachteten Veränderungen zeigen deutlich, dass die Konversion des Subtyps II (YcgF) in den Subtyp I (SyPixD) gelungen ist. Hierbei gehen die photochemischen Änderungen jedoch nicht ausschließlich in die Richtung der alleinstehenden SyPixD, TePixD,

BlrB und BlrP1 BLUF-Domänen, sondern auch in Richtung der komplexen AppA-Domäne. Demnach scheint die *E. coli* YcgF-(1-137)_M23I_A90W BLUF-Domäne bis zu einem gewissen Grad grundsätzliche Merkmale, sowohl der alleinstehenden als auch der komplexen BLUF-Photorezeptoren in sich zu vereinen. Im Gegenzug scheinen jedoch gleichermaßen vorhandene subtypische Charakteristika der *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domäne, wie z.B. die aufgrund der globalen strukturellen Änderungen für die Dunkelreversion zu überwindende Aktivierungsenergie und die geringe blaulichtinduzierte Rotverschiebung bestehen zu bleiben oder sogar verstärkt zu werden.

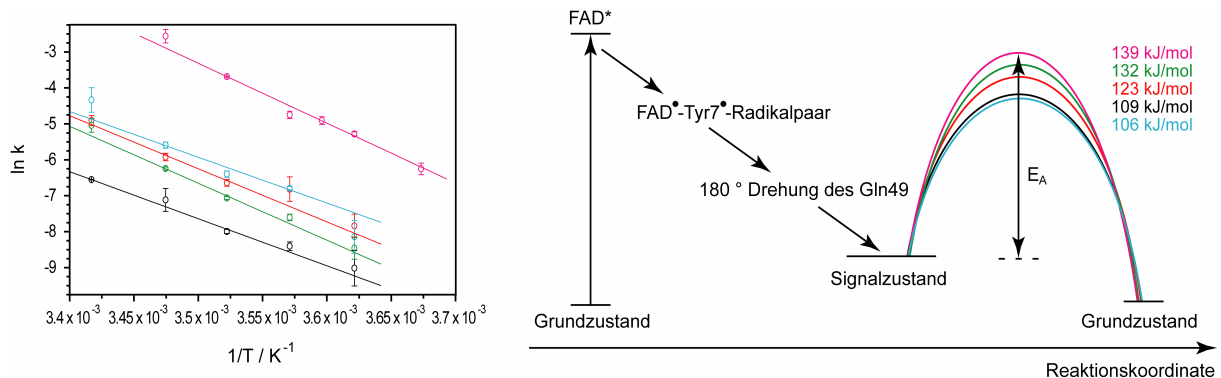


Abbildung 5.5: A) Arrheniusplots der Dunkelreversion und B) schematisches Energiediagramm zur Verdeutlichung der unterschiedlichen Aktivierungsenergien der verschiedenen mit FMN rekonstituierten *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domänen. YcgF-(1-137) (schwarz), YcgF-(1-137)_Y7F (blau), YcgF-(1-137)_M23I (rot), YcgF-(1-137)_M23L (grün), YcgF-(1-137)_A90W (hellblau) und YcgF-(1-137)_M23I_A90W (pink).

5.1.4. Der *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domänen Photozyklus

Für den Photozyklus der BLUF-Domänen enthaltenden Proteine werden zurzeit vier verschiedene Mechanismen diskutiert:

Der erste Mechanismus beschreibt eine lichtinduzierte Drehung der Amidseitenkette eines in allen BLUF-Domänen konservierten Glutaminrestes (Q49 in YcgF) um 180°, wobei dieser anschließend eine Wasserstoffbrücke zum O4-Atom des Flavins im Signalzustand ausbildet.^[25, 27, 37-40] In diesem Mechanismus befindet sich der Tryptophanrest (A90 in YcgF) im Dunkelzustand in der W_{in} - und im Signalzustand in der W_{out} -Konformation.^[25]

In einem zweiten Mechanismus wird der Signalzustand nach einer Tautomerisierung und 180° Drehung des selbigen Glutaminrestes, der auch hier eine Wasserstoffbrücke zum O4-Atom des Flavins ausbildet, generiert. Hierbei liegt der Tryptophanrest in der dunkeladaptierten BLUF-Domäne in der W_{out} -Form vor und wechselt nach

Blaulichbestrahlung in den W_{in} -Zustand. Diese W_{in} -Konformation kann jedoch nur nach der Tautomerisierung des Glutaminrestes eingenommen werden.^[41]

Im dritten Modell tautomerisiert der Glutaminrest lediglich, um im lichtadaptierten Zustand die Wasserstoffbrücke zum Flavinsauerstoffatom ausbilden zu können. In diesem Mechanismus verursacht der Wechsel des Tryptophanrestes von einer Konformation in die andere die Tautomerisierung des Glutaminrestes.^[34, 42]

Im vierten Mechanismus finden weder eine Drehung noch eine Tautomerisierung des Glutaminrestes statt. In diesem Modell verändern sich lichtinduziert und durch den Wechsel des Tryptophans von der W_{out} - in die W_{in} -Konformation die vom konservierten Glutamin gebildeten Wasserstoffbrückenbindungen. Hierbei bildet sich eine neue Wasserstoffbrücke vom konservierten Glutamin zum Tryptophan aus, infolgedessen wird die Wasserstoffbrücke zwischen demselben Glutamin und dem O4-Atom des FAD gedehnt (Abb. 5.6).^[48]

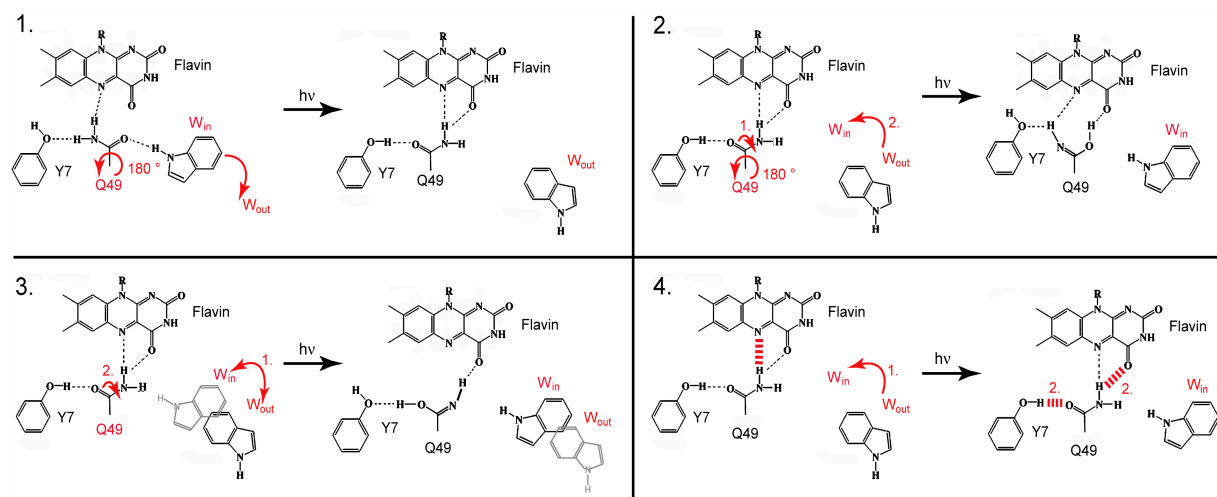


Abbildung 5.6: Zusammenfassung der wesentlichen Abläufe der vier potentiellen Mechanismen des BLUF-Domänen Photozyklus.

In der nativen *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domäne kann der Photozyklus nicht über den dritten Mechanismus ablaufen, da dieser die Änderung der Tryptophankonformation von W_{in} nach W_{out} oder umgekehrt voraussetzt.^[34, 42] Da an dieser Position jedoch in der *E. coli* BLUF-Domäne ein Alaninrest vorhanden ist, können neben dem dritten Mechanismus auch Mechanismus zwei und vier ausgeschlossen werden.

Auch im ersten Modell wird ein lichtinduzierter Wechsel des Tryptophanrestes von der W_{in} - in die W_{out} -Konformation beschrieben, jedoch ist dieser Wechsel kein notwendiger Bestandteil im Ablauf dieses Mechanismus.^[37] Daher scheint der Photozyklus in der *E. coli*

BLUF-Domäne am wahrscheinlichsten über die 180 ° Drehung des Glutaminrestes 49 abzulaufen.

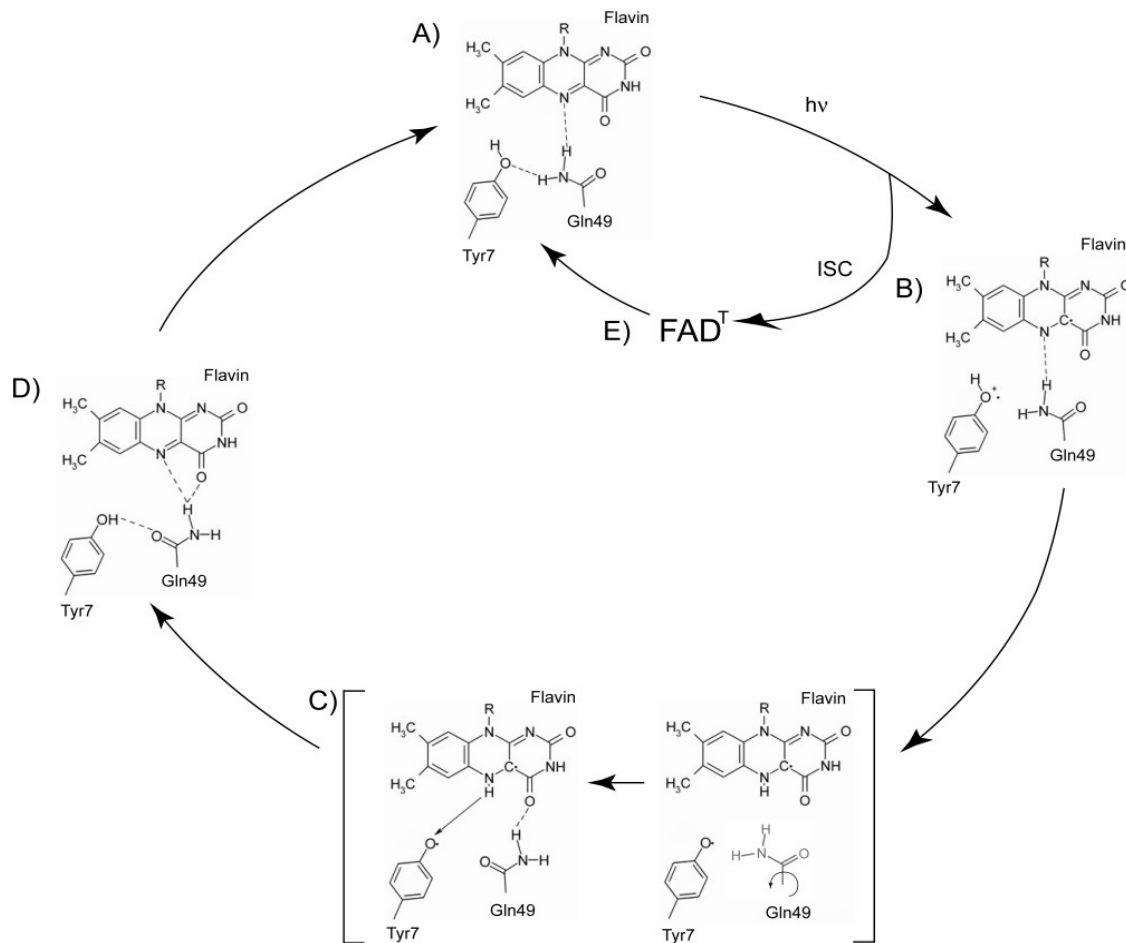


Abbildung 5.7: Möglicher Photozyklus der *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domäne. A) Grundzustand der YcgF-(1-137) BLUF-Domäne, B) FAD[•]-Tyr7[•]-Radikalpaar, C) 180 ° Drehung des Glutamin 49, D) Signalzustand und E) durch *Intersystem Crossing* generierter Triplettzustand des FAD.

Dieser Mechanismus beginnt mit der blaublichtinduzierten Ausbildung eines angeregten Flavinzustandes, der nach einer Reihe von Elektronen- und Protonentransferprozessen und der Neuordnung des Wasserstoffbrückennetzwerkes in den Signalzustand übergeht. Da auch in der *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domäne die Y7F-Mutante nicht in der Lage war, den rotverschobenen Signalzustand auszubilden, scheint das Tyrosin 7 hier ebenfalls als Elektronendonator zu agieren und ein Elektron auf den Isoalloxazinring zu übertragen. Im nächsten Schritt kann der Tyrosinrest 7 zunächst als Protonendonator für das Glutamin 49 dienen und im Anschluss daran ein FADH[•]-Tyr7[•]-Radikalpaar ausbilden. Im Verlauf dieser Prozesse brechen die Wasserstoffbrücken des Glutamins 49 zum Tyrosin 7 und zum N5-Atom des Flavins, so dass sich der nun „freie“ Glutaminrest um 180 ° drehen kann. Nach dieser

Drehung wird das Tyrosin 7 wieder reprotoniert, so dass sich neue Wasserstoffbrücken zwischen dem Glutamin 49 und dem Tyrosin 7, sowie dem O4-Atom des Flavins ausbilden können (Abb. 5.7). Der Bruch und die Neuordnung des Wasserstoffbrückennetzwerks können jedoch in der nativen YcgF-(1-137) BLUF-Domäne zusätzlich durch eine eventuelle Umlagerung des Methioninrestes 23 und die daran geknüpften globalen strukturellen Änderungen beschleunigt werden. Parallel zum Signalzustand kann auch in der *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domäne die Ausbildung eines Triplettzustandes erfolgen. Dieser kann wie zuvor für die AppA BLUF-Domäne beschrieben, wieder direkt in den Grundzustand zurück relaxieren.^[36, 46]

In der *E. coli* YcgF-(1-137)_M23I_A90W BLUF-Domäne könnte der Photozyklus auch über einen der anderen drei Mechanismen ablaufen, da die Mutante den für diese Abläufe benötigten Tryptophanrest 90 beinhaltet. In der Doppelmutante scheint dieses Tryptophan im Dunkelzustand in der W_{in} - und im Signalzustand in der W_{out} -Konformation vorzuliegen. Folglich können der zweite und vierte Mechanismus in denen der Wechsel des Tryptophans vom dunkeladaptiertem W_{out} - in Richtung lichtadaptierten W_{in} -Zustand abläuft, direkt ausgeschlossen werden. Daher könnte der Photozyklus für die *E. coli* YcgF-(1-137)_M23I_A90W Mutante ähnlich dem Wildtyp nach dem ersten Mechanismus oder auch nach dem dritten Mechanismus unter Tautomerisierung des Glutaminrestes 49 ablaufen. Die Konversion von der 180 ° Drehung des konservierten Glutamin 49 hin zu einer Tautomerisierung könnte hierbei durch den eingefügten Isoleucin- 23 als auch Tryptophanrest 90 bedingt werden. In der *E. coli* YcgF-(1-137)_M23I_A90W Mutante können nun jedoch der eingefügte Tryptophanrest 90, über einen Konformationwechsel, und der anstelle des Methionin 23 vorhandene Isoleucinrest die Umlagerung des Wasserstoffbrückennetzwerks beschleunigen oder gar induzieren. Auf diese Weise scheint die Signalweiterleitung auch in der *E. coli* YcgF-(1-137) Doppelmutante gewährleistet zu sein.

5.1.5. Signalweiterleitung in der *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domäne

In der *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domäne konnten ^1H und $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ NMR-spektroskopisch globale strukturelle Änderungen beim Vergleich ihrer dunkel- und lichtadaptierten Zustände beobachtet werden. Diese umfassenden Änderungen wurden einer blaulichtinduzierten Bewegung der im Dunkelzustand mit der BLUF-Domäne interagierenden C-terminalen

α -helikalen Extension relativ zur Domänenoberfläche zugeschrieben, ähnlich der $J\alpha$ -Helix in LOV2-Domänen pflanzlicher Phototropine (Abb. 5.8).^[45]

Die Umlagerung der C-terminalen α -Helix während der Signalübertragung könnte im *E. coli* YcgF-(1-137) dadurch gewährleistet sein, dass wie in der *K. pneumoniae* BLUF-Domäne, die beiden C-terminalen α -Helices, im Vergleich zu den meisten BLUF-Photorezeptoren des Subtyps I um 90 ° verdreht, vorliegen.^[14, 23] Auf diese Weise kann das Blaulichtsignal auf die EAL-Effektordomäne übertragen werden.

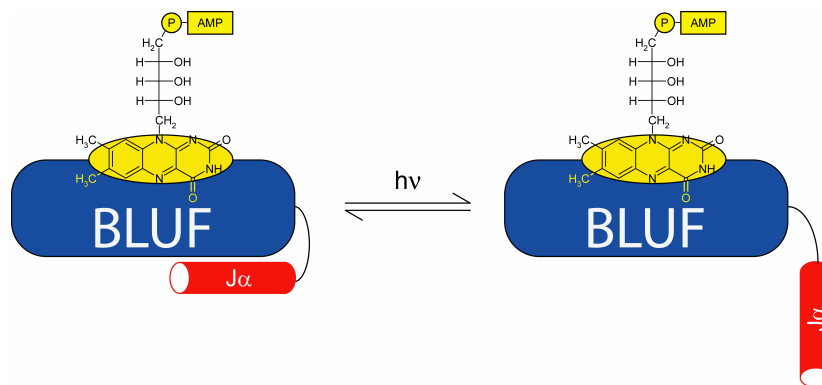


Abbildung 5.8: Blaublichtinduzierte strukturelle Änderungen der C-terminalen $J\alpha$ -Helix in der *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domäne.

Anhand der vorliegenden Resultate können nun eventuelle Übertragungswege des lichtinduzierten Signals vom Flavinisoyaloxazinring bis zur C-terminalen α -Helix analysiert werden. In der *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domäne können die lichtinduzierten für die Ausbildung des Signalzustandes erfolgten Änderungen ihren Ursprung in der 180 ° Drehung des Glutaminrestes 49 haben. Hierbei könnte die 180 ° Drehung des Glutamins 49 einen Impuls auf den ebenfalls in der Isoaloxazinumgebung vorliegenden Methioninrest 92 übertragen. In der bakteriellen BLUF-Domäne entfällt zwar die für den Subtyp I beschriebene Umlagerung des Tryptophan oder Threoninrestes und die daraus eventuell resultierende Tautomerisierung des konservierten Glutamins,^[14, 23, 49, 50] jedoch könnte eine mögliche Umorientierung des Methioninrestes 23 weitere strukturelle Änderungen triggern. Dieses Methionin 23 befindet sich auf der $\alpha 1$ -Helix und kann durch seine lichtinduzierte Umlagerung eine Bewegung dieser Helix bewirken. Nachfolgend kann eventuell ein auf dieser Helix befindliches Asparagin 31, das ca. 3.58 Å vom Methionin 92 entfernt ist, dieses weitere Signal auf den Methioninrest 92 übermitteln. Dieses Methionin 92 ist Teil eines flexiblen Loops zwischen den $\beta 4$ - $\beta 5$ -Strängen und kann über Verringerung eines im Dunkelnzustand vorliegenden Knickes im $\beta 5$ -Strang die strukturelle Veränderung auf die

C-terminale J α -Helix der YcgF-(1-137) BLUF-Domäne übertragen, ähnlich wie für BlrP1 beschrieben^[14] (Abb. 5.9A). Diese mögliche Kopplung beider Ausgangssignale könnte zusätzlich zu der in der YcgF-(1-137) BLUF-Domäne ^1H und ^1H , ^{15}N NMR-spektroskopisch zu beobachtenden lichtinduzierten Bewegung der C-terminalen J α -Helix die Unterschiede zwischen dem dunkel- und lichtadaptierten Blaulichtrezeptor erklären. Zwei Signalübertragungswege wurden auch für die lichtgetriggerte umfassende strukturelle Änderungen aufweisende BlrP1 BLUF-Domäne identifiziert. In diesem Blaulichtrezeptor verläuft der zweite Weg jedoch über zusätzliche Änderungen eines Leucinrestes, der sich in der Nähe des $\beta 5$ -Stranges befindet.^[23]

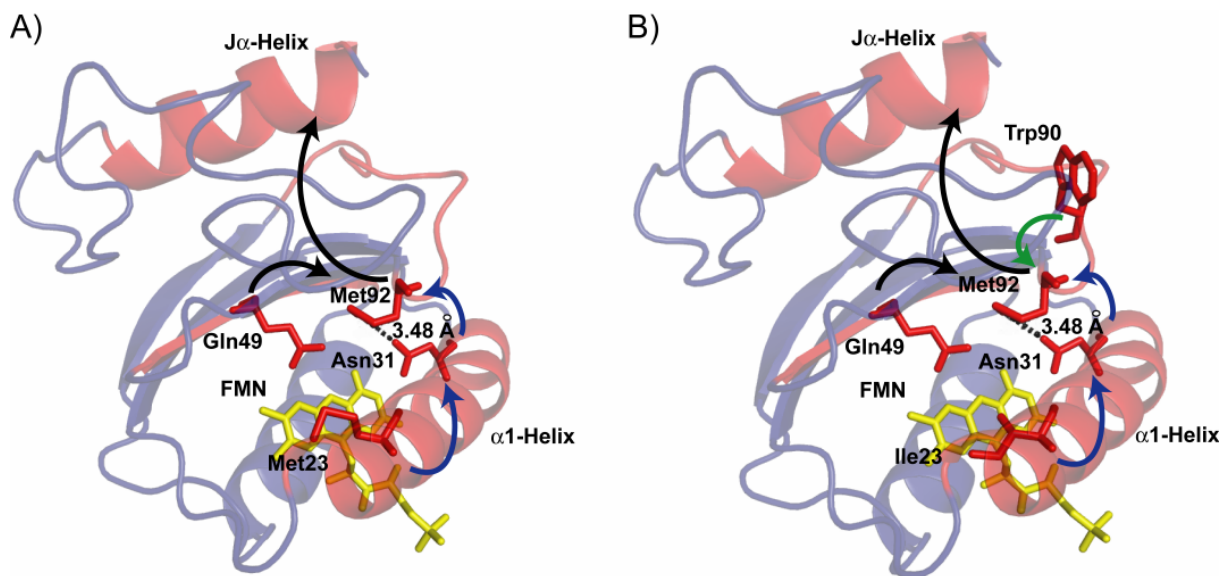


Abbildung 5.9: Signalübertragungswege in der *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domäne. A) Nativer BLUF-Photorezeptor, B) M23I_A90W Doppelmutante. Das dargestellte 3D-Modell wurde anhand der *R. sphaeroides* BlrB Kristallstruktur (PDB ID: 2bycB) mit dem Server SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) im *First Approach Mode* generiert.^[158] Die an der Signalweiterleitung beteiligten Aminosäuren und Sekundärstrukturelemente sind in rot dargestellt. Ebenfalls gezeigt sind die Impulsweiterleitung ausgehend vom Glutamin 49 (schwarze Pfeile), die Signalübertragung ausgehend von einer eventuellen Umlagerung des Methionin 23 (blaue Pfeile) und in der Doppelmutante ein möglicher weiterer Weg beginnend mit dem lichtinduzierten Wechsel des Tryptophan 90 von der W_{in} - in die W_{out} -Konformation (grüner Pfeil).

In der *E. coli* YcgF-(1-137)_M23I_A90W Mutante kann nun die Umlagerung des eingefügten Tryptophans die bestehenden und nicht durch den Austausch des Methioninrestes inhibierten lichtinduzierten Signalübertragungswege ergänzen (Abb. 5.9B). Diese durch den

Das im Verlauf der lichtinduzierten Konformationsänderungen in der *E. coli* YcgF BLUF-Domäne generierte und auf die C-terminale J α -Helix weitergeleitete Signal kann nun wiederum durch den zuvor beschriebenen Bewegungsablauf der Helix auf die nachfolgende C-terminale EAL-Effektordomäne übertragen werden.

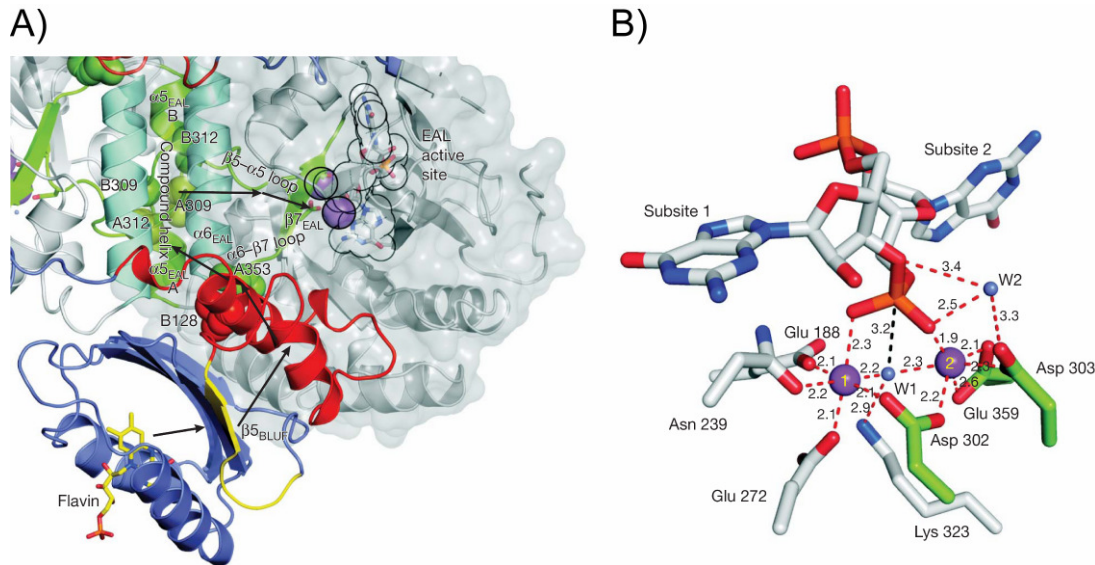


Abbildung 5.10: A) Signalübertragungsweg in BlrP1 aus *K. pneumoniae* und B) aktives Zentrum der EAL-Domäne von BlrP1. Dargestellt ist die Signalübertragung ausgehend vom Flavin (gelb), weitergeleitet über die BLUF-Domäne (blau) bis zur EAL-Domäne (grau) durch schwarze Pfeile. Hervorgehoben sind die C-terminale $\alpha 4$ -Helix (rot), der $\beta 4$ - $\beta 5$ -Loop und der $\beta 5$ -Strang (gelb), die $\alpha 5$ -Verbindungshelix (grün), der Loop (grün) zwischen der $\alpha 6$ -Dimerisierungshelix (hellblau) und dem $\beta 7$ -Strang (grün). Im aktiven Zentrum der EAL-Domäne ist die essentielle Koordination des Manganions 2 (lila) und des Wassermoleküls (blau) durch den Glutamatrest 359 (grün) gezeigt.^[14]

Hierbei könnte, wie im dimeren BlrP1, die lichtinduzierte Bewegung der J α -Helix (α 4-Helix im BlrP1) der BLUF-Domäne, die mit der EAL-Domäne des zweiten Monomers interagiert, das Signal auf einen Loop zwischen der α 6-Helix und dem β 7-Strang dieser EAL-Domäne weiterleiten. Dieses Signal kann anschließend auf den β 7-Strang und über die α 6-Dimerisierungshelix auf die α 5-Verbindungshelix der EAL-Domäne übertragen werden.^[14] In der EAL-Domäne von BlrP1 induziert der übermittelte Impuls die 90 ° Drehung eines katalytisch essentiellen Glutamatrestes 359, welcher anschließend ein Metallion (Mg²⁺ oder Mn²⁺) und ein Wassermolekül koordinieren kann und auf diese Weise den

Hydrolyseprozess des c-di-GMP initiiert (Abb. 5.10).^[14, 183] In der EAL-Domäne von YcgF hingegen, die anstelle des Glutamat ein Methionin aufweist und keine Phosphodiesteraseaktivität besitzt, könnten diese Konformationsänderungen die Affinität zur N-terminalen MerR-ähnlichen Domäne des Repressors YcgE erhöhen. Infolgedessen kann YcgF an YcgE binden und den Biofilmbau induzieren (Abb. 5.11).^[14, 16]

5.1.6. Funktionelle Eigenschaften der *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domäne

Die *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domäne kann wie beschrieben sowohl als Blaulicht- als auch als potentieller Temperatursensor agieren. Beide sensorischen Eigenschaften der bakteriellen BLUF-Domäne sind wichtig für die Regulation verschiedener Biofilmbauprozesse, um die Balance zwischen Mobilität und Sessilität zu halten. Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass die EAL-Domäne durch blaulichtinduzierte strukturelle Änderungen an die MerR-ähnliche Domäne des Antirepressors YcgE bindet und diesen von der Operatorbindungsstelle ablöst. Dieser Vorgang induziert die Produktion von acht Proteinen, die wiederum Prozesse für den Biofilmbau in Gang setzen.^[16] Hierbei kann eine kälteinduzierte Verzögerung der Rückkonversion des Signalzustandes auch bei tiefen Temperaturen die für den Biofilmbau notwendige Genexpression gewährleisten, um so einen stärkeren Impuls in Richtung Mobilität der Bakterien auszuüben. Eine ebenfalls kälteinduzierte Erhöhung der YcgF-Überexpression zeigt, dass die Bakterien bei tiefen Temperaturen auf die Bewahrung ihrer Mobilität angewiesen sind (Abb. 5.11). Dies konnte durch *Cold-Shock* Stimulation der Bakterien bei Temperaturen von 23 °C beobachtet werden.^[16, 184, 185] Diese Notwendigkeit der verzögerten Dunkelreversion könnte auch die Toleranz dieses Effektes gegenüber dem Austausch der Methionin und Alaninreste in der *E. coli* YcgF BLUF-Domäne erklären, obwohl sich die eigentliche Zeitdauer der Rückkonversion verringert.

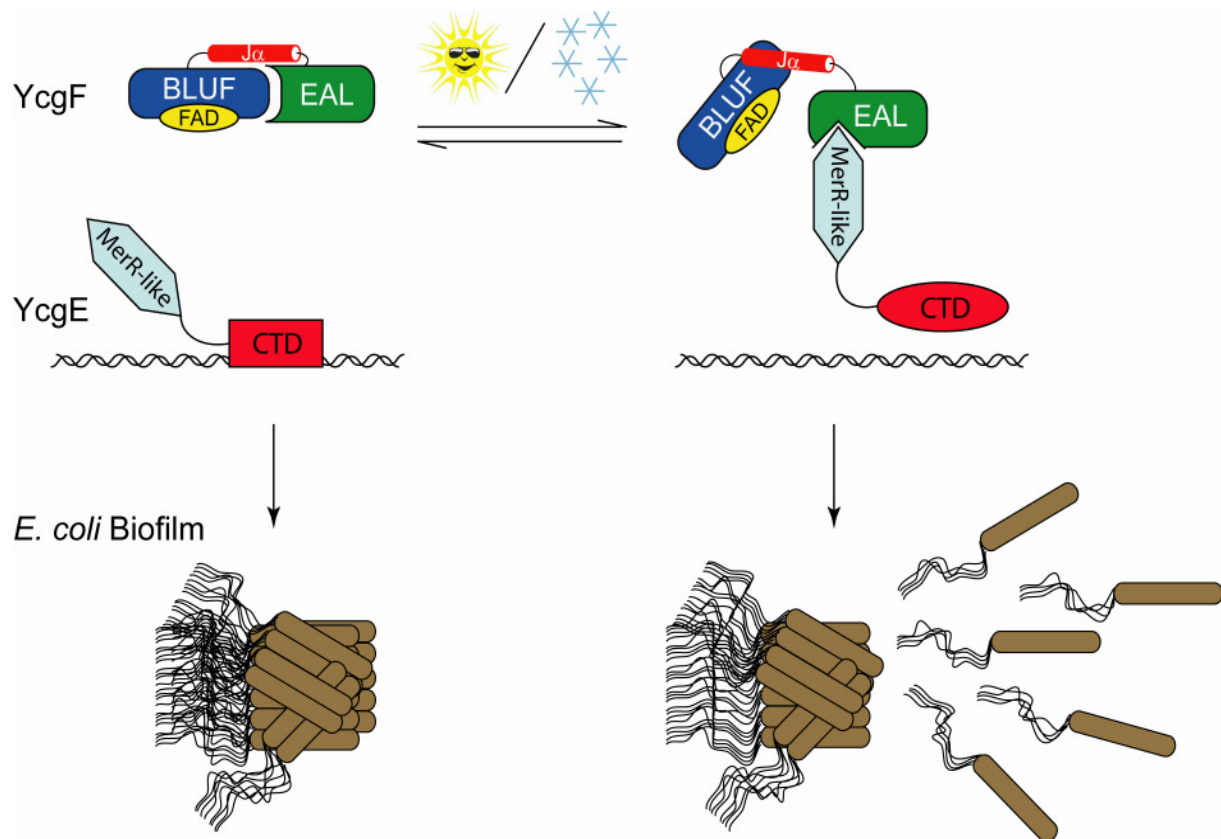


Abbildung 5.11: Schematische Darstellung der gekoppelten photo- und temperatursensorischen Eigenschaften der *E. coli* YcgF BLUF-Domäne und ihre Interaktion mit YcgE. Unter Lichteinstrahlung bildet die YcgF BLUF-Domäne ihren Signalzustand aus, der konformationelle Änderungen in der C-terminalen EAL-Domäne induziert. Daraufhin ist diese in der Lage, an die MerR-like Domäne des YcgE zu binden, so dass YcgE von der Operatorbindungsstelle abdissoziiert. Dieser Vorgang setzt eine Reihe von Mechanismen in Gang, in Folge derer die *E. coli* Bakterien aus ihren Biofilm abwandern können. Niedrige Temperaturen verzögern hierbei die Rückkonversion des Signalzustands der YcgF BLUF-Domäne. Auf diese Weise wird die Mobilität der Bakterien garantiert.

Diese in der *E. coli* YcgF BLUF-Domäne beobachtete Kopplung von sensorischen Eigenschaften zur Wahrnehmung zweier Umwelteinflüsse ist jedoch kein Einzelfall, da tierische und pflanzliche Cryptochrome ihrerseits als blaulichabhängige Magnetorezeptoren agieren können.^[186-189]

5.1.7. Anwendungsbeispiel

In der *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domäne kann über den Austausch von Aminosäuren die Stabilität des Signalzustandes subtypenübergreifend reguliert werden. Diese Regulierung der Signalübertragung einer Photorezeptordomäne bietet eine Anwendungsmöglichkeit im Bereich der synthetischen Mikrobiologie. Hierbei könnten verschiedene durch

Effektordomänen kontrollierte Antworten in Abhängigkeit vom Zeitintervall des zu übertragenen Signals untersucht werden. Für diese Analysemethode könnte die *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domäne an unterschiedliche Effektordomänen, wie EAL, GGDEF, Zyklasten, SCHICH, HTH-Motive, Thr/ Ser-Kinasen usw. gekoppelt werden (Abb. 5.12). Eine erfolgreiche Verknüpfung zwischen zwei nicht natürlich in einem Protein vorkommenden BLUF-Photorezeptor- und Effektordomänen konnte bereits am Beispiel der *Euglena gracilis* PAC α 1-BLUF-Domäne, die an die C-terminale SCHICH-Domäne des *R. sphaeroides* AppA gekoppelt wurde, gezeigt werden. Dieses künstliche Bidomänenprotein war ähnlich dem nativen AppA in der Lage, lichtinduziert den Repressor PspR abdissoziieren zu lassen.^[190] Auf diese Weise könnten neben BLUF-Domänen auch LOV-Domänen als Inputdomänen ersetzt werden, um die weitere Ähnlichkeiten in der Signalübertragung beider Photorezeptorfamilien zu charakterisieren.

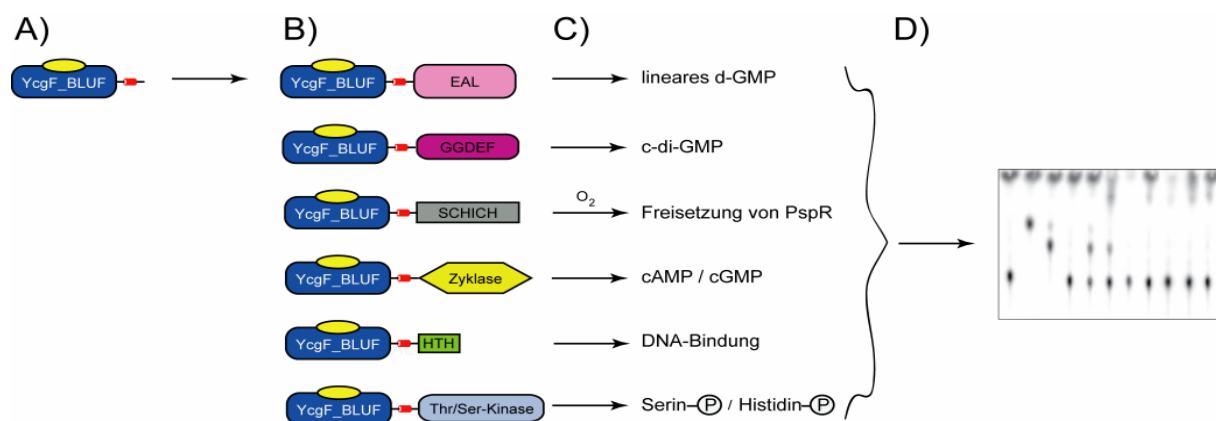


Abbildung 5.12: Schema eines möglichen Ablaufs für die Verwendung der *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domäne zur Untersuchung blaulichtinduzierter durch verschiedene Effektordomänen ausgeübte Antworten. Hierfür wird zunächst die YcgF-BLUF-Domäne (A) mit verschiedenen Effektordomänen verknüpft (B). In einem nächsten Schritt können die verschiedenen lichtinduzierten Reaktionen der Effektordomänen, z.B. in Abhängigkeit von der Übertragungsdauer des eingehenden Signals analysiert werden (C). Nach ausreichender Charakterisierung der entsprechenden Photoantwort kann das jeweilige System als Kontrolle für die Etablierung bzw. Durchführung von Assays verwendet werden (D).

Als Anwendungsmöglichkeit hieraus würde sich die Entwicklung und Etablierung von Assays anbieten. Hierbei könnte eine langlebige Signalübertragung und die daran gekoppelte quantitativere Umsetzung von Substraten helfen die Assaybedingungen anzupassen bzw. geeignete Positivkontrollen zu schaffen. Bei schnellen bzw. zeitaufgelösten Untersuchungen könnte hingegen die *E. coli* YcgF-(1-137)_M23I_A90W BLUF-Domäne als Input-Modul verwendet werden.

5.2. Konversion der *A. thaliana* (6-4)-DNA-Photolyase in den CPD-Subtyp

DNA-Photolyasen wurden aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeiten und hohen Spezifität für den entsprechenden von ihnen zu reparierenden DNA-Schaden in CPD- und (6-4)-Photolyasen klassifiziert (Abb. 5.13).

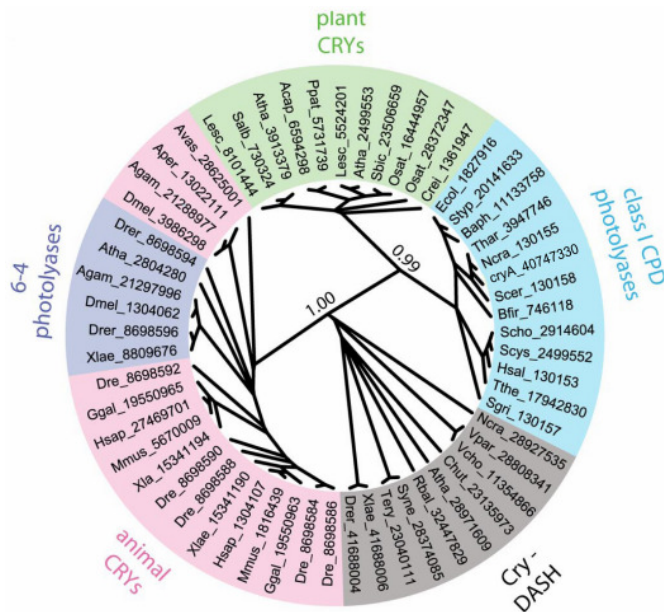


Abbildung 5.13: Radiales Kladogramm der phylogenetischen Verwandtschaftsbeziehungen der Photolyase/Cryptochrom Familie.^[191]

Zur Konvertierung einer (6-4)-Photolyase in den CPD I-Subtyp wurden vom *A. thaliana* (6-4)-Enzym, für das bereits anhand von Photoreaktivierungsstudien die Reparaturaktivität für den (6-4)-Schaden nachgewiesen wurde,^[78, 109] Oberflächenmutanten rekombinant hergestellt. Diese Mutanten enthalten in ihrer katalytischen Bindungstasche spezifische für die Erkennung, Bindung und Reparatur von CPD-Schäden benötigte, in CPD-Photolyasen konservierte Aminosäurereste. Anhand der erhaltenen Daten aus spektroskopischen Untersuchungen, Bindungs- und Reparaturassays wird der Einfluss der eingefügten Aminosäuren auf die Stabilität, photochemischen Eigenschaften und die veränderte CPD-Substratspezifität im Vergleich zur nativen (6-4)-Photolyase diskutiert. Zum Schluss werden sowohl die katalytischen als auch die strukturellen Unterschiede zwischen (6-4)- und CPD-Photolyasen, sowie DASH-Cryptochromen in Bezug auf die Erkennung und Reparatur der jeweiligen Photoschäden erörtert.

5.2.1. Allgemeine Eigenschaften der rekombinanten *A. thaliana* (6-4)-Photolyasen

Neben der nativen *A. thaliana* (6-4)-DNA-Photolyase konnten ihre Oberflächenmutanten mit Ausnahme der Q298E Variante erfolgreich wie alle zuvor charakterisierten Photorezeptoren der Photolyase/ Cryptochrom Klasse als monomere Enzyme aufgereinigt werden.^[73] Das in der Q298E-Mutante ausgetauschte Glutamin bildet Wasserstoffbrücken zum 3'-Pyrimidin des (6-4)-Schadens aus und fördert auf diese Weise die Photoreaktivierung. Zusätzlich stabilisiert das Glutamin 298 über Wasserstoffbrücken ein Lysin 244, das wiederum über Salzbrücken an der FAD-Bindung beteiligt ist (Abb. 5.14).^[85] Ein Austausch dieses Glutaminrestes könnte demnach zu einer reduzierten FAD-Bindungsaffinität führen und somit den Verlust des katalytischen Kofaktors und die daraus resultierende Aggregation der Q298E Mutante im Verlauf der Aufreinigung erklären. Dieser Effekt wurde jedoch nicht für die Q288A Mutante der *X. laevis* (6-4)-Photolyase beobachtet, die in ähnlicher Ausbeute wie das native Enzym aufgereinigt werden konnte.^[108] Daher interagiert entweder das FAD in der *X. laevis* Photolyase nicht mit dem Lysinrest oder die Affinität des FAD wird in der *A. thaliana* (6-4)-Photolyasenmutante Q298E möglicherweise durch zwischen dem Glutamat und Lysin vorliegenden ionischen Wechselwirkungen verringert.

Aus diesem Grund konnte in der *A. thaliana* (6-4)-Photolyase der Einfluss des eingefügten Glutamats auf die Bindung und Reparatur eines CPD-haltigen Oligonukleotids nicht analysiert werden. In der Q298E Mutante hätte der Glutamatrest zum einen die Bindung des CPD-Schadens eventuell über Wasserstoffbrückenbindungen zu den C4-Carbonyl- und N3-Imidgruppen des 5'-Thymins fördern können. Zum anderen hätte der Rest durch Protonierung dieses 5'-Thymins einen Rückelektronentransfer vom CPD-Schaden auf das FAD verhindern und so die Spaltung des Thymindimers vorantreiben können.^[73]

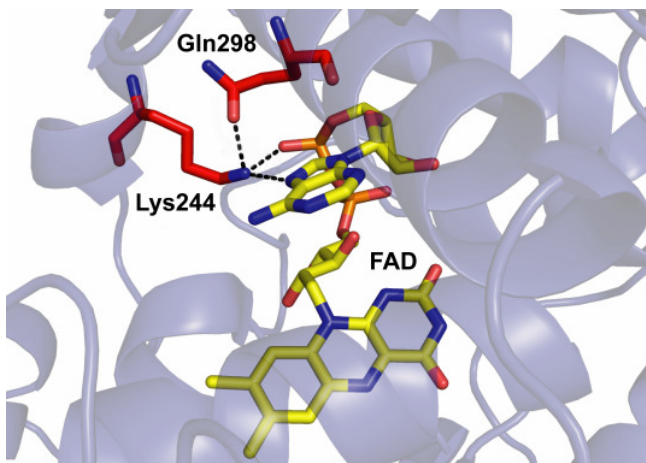


Abbildung 5.14: FAD-Bindungstasche der *A. thaliana* (6-4)-DNA-Photolyase (PDB ID: 3FY4). Dargestellt sind die Wasserstoffbrücken zwischen dem Glutamin- 298 und Lysinrest 244 und zwischen Lysin 244 und dem FAD.

Im Gegensatz zum Glutamin 298 scheinen die ausgetauschten Reste Lysin 246, Histidin 364, Histidin 368, Leucin 365, Tryptophan 408 und Phenylalanin 427 keinen wesentlichen Anteil an der Bindung des katalytischen FAD-Kofaktors zu besitzen. Dies zeigte zum einen ein Protein/ Kofaktor Verhältnis von $\sim 1:1$, das dem nativen Protein entspricht, und zum anderen für alle *A. thaliana* (6-4)-Photolyasen bestimmte ähnliche $OD_{450/280}$ Quotienten im Bereich von 0.073 bis 0.082. Des Weiteren scheint der Aminosäureaustausch die FAD-Umgebung nur in sehr geringen Maßen zu verändern, da sowohl in der nativen *A. thaliana* (6-4)-Photolyase als auch in ihren Mutanten FAD im oxidierten Zustand gebunden ist. Hierbei besaßen die Absorptionsmaxima des oxidierten FAD-Zustands aller *A. thaliana* (6-4)-Photolyasen eine identische Feinstruktur. Lediglich für die F427Q-Mutante konnte ein geringer Anteil der neutralen semichinoiden FAD-Form von $\sim 5\%$ festgestellt werden. Demnach scheinen das native (6-4)-Enzym und seine Oberflächenmutanten *in vitro* den oxidierten FAD-Zustand zu stabilisieren, ähnlich der *X. laevis* (6-4)-Photolyase, der *A. thaliana* CPD-Klasse II Photolyase und der *E. coli* CPD-Photolyase.^[47-49] Dieses Verhalten korreliert mit den Ergebnissen der Einzelmутanten der *X. laevis* (6-4)-Photolyase, die jeweils anstelle der nativen Histidin- 354, Leucin- 355, Histidin- 358 und Tryptophanreste 398 einen Alaninrest aufweisen, der ebenfalls die Flavinbindung nicht direkt beeinflusst.^[108]

In allen rekombinant produzierten *A. thaliana* (6-4)-Photolyasen konnte wie im Fall der *D. salina*, *X. laevis* und *O. tauri* (6-4)-Photolyasen, sowie der *T. thermophilus* CPD-Klasse I und *A. thaliana* CPD-Klasse II Photolyasen neben dem katalytischen FAD-Kofaktor kein Antennenchromophor detektiert werden.^[75, 149, 173, 192-194] Kürzlich wurde jedoch in der *D. melanogaster* (6-4)-Photolyase durch Rekonstituierungsexperimente und durch *soaking* an Kristallen der Einbau von 8-HDF als Antennenchromophor gezeigt.^[81] Prinzipiell wäre der Einbau von 8-HDF auch für die *A. thaliana* (6-4)-Photolyase denkbar; doch kann dieser, im rekombinant produzierten Enzym nicht nachgewiesen werden, da *E. coli* Zellen keinen Syntheseweg für diesen Kofaktor besitzen.

Für alle *A. thaliana* (6-4)-Photolyasemutanten konnte im Vergleich zum Wildtyp anhand von CD-spektroskopischen Untersuchungen keine Veränderung im Faltungsverhalten der Sekundärstrukturelemente beobachtet werden. Ebenso wurde lediglich ein geringer mutationsbedingter Einfluss auf die thermische Stabilität festgestellt. Hierbei scheint in den Dreifachmutanten H364N_L365R_H368M und H364N_L365R_H368Q der Austausch beider Histidinreste eine Verringerung der thermischen Stabilität zu bewirken. Beide Aminosäuren gehören zu einer His368-His364-Tyr422 Triade und scheinen als Teil dieser die *A. thaliana* (6-4)-Photolyase über die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zu stabilisieren.^[104]

Im Unterschied zu den Dreifachmutanten scheinen in der K246R als auch in der W408Y Mutante einige Sekundärstrukturelemente partiell stabilisiert zu sein. Diese Stabilisierung könnte durch zusätzliche mutationsbedingte Wasserstoffbrückenbindungen zu anderen Aminosäuren oder zum katalytischem FAD Kofaktor bedingt sein.

5.2.2. Einfluss der in der *A. thaliana* (6-4)-Photolyase ausgetauschten Aminosäuren auf die CPD-Substratspezifität

Die für die Reparaturassay benötigte reduzierte, katalytisch aktive FAD-Form konnte in allen aufgereinigten *A. thaliana* (6-4)-Photolyasen durch chemische Reduktion mit Dithionit nach 30 bis 40 min generiert werden. Hierbei zeigten die Oberflächenmutanten des pflanzlichen (6-4)-Enzyms ein dem Wildtyp vergleichbares Reduktionsverhalten und sind demnach in der Lage wie das native Enzym den reduzierten FAD-Zustand zu stabilisieren. Diese Methode, bei welcher der katalytische FAD-Kofaktor direkt und nicht über die Tryptophan-Triade reduziert wird,^[169] kann bei Photolyasen angewendet werden, da in diesen Enzymen das FAD vom Lösungsmittel aus zugänglich ist (Abb. 5.15). Eine erfolgreiche chemische Reduktion des katalytischen Kofaktors konnte zuvor lediglich für die *E. coli* und *T. thermophilus* CPD-Photolyasen beobachtet werden.^[59, 60] Somit erfüllen die *A. thaliana* (6-4)-Photolyasemutanten die Voraussetzung für die Reparatur von DNA-Schäden.

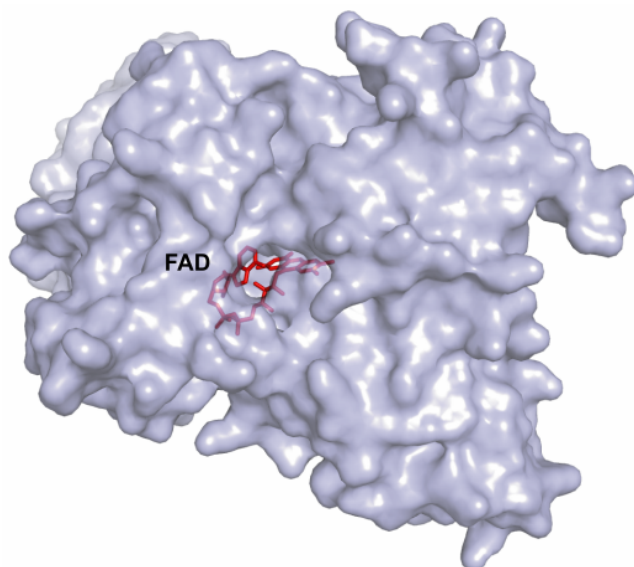


Abbildung 5.15: Oberflächendarstellung der *A. thaliana* (6-4)-DNA-Photolyase (PDB ID: 3FY4). In der Struktur ist der katalytische FAD-Kofaktor (rot) vom Lösungsmittel direkt zugänglich.

Die native *A. thaliana* (6-4)-Photolyase bindet ungeschädigte DNA mit Bindungskonstanten von 25 nM für doppelsträngige und 62 nM für einzelsträngige DNA. Lediglich für die *D. salina* (6-4)-Photolyase (Abschnitt 4.3.4) und das menschliche DASH Cryptochrom 2 (ssDNA: $K_D \sim 5$ nM, dsDNA: $K_D \sim 100$ nM) konnten unspezifische Dissoziationskonstanten

im nanomolarem Bereich detektiert werden.^[195] Im Gegensatz dazu sind die zuvor für Photolyasen berichteten unspezifischen Dissoziationskonstanten um den Faktor 10^5 erhöht.^[96] Ein Vergleich mit den spezifischen Dissoziationskonstanten anderer Photolyasen, wie z.B. die *X. laevis* (6-4) (ssDNA: 18 nM, dsDNA: 4.7 nM), die *E. coli* CPD (dsDNA: 3.8 nM), *M. thermoautotrophicum* CPD (dsDNA: 0.7 nM) und die *C. crescentus* CPD III Photolyase (dsDNA: 1 nM) zeigt, dass die für das *A. thaliana* (6-4)-Enzym beobachteten Werte innerhalb dieser Größenordnung liegen.^[72, 75, 96, 97] Ein Effekt des pH-Wertes bzw. des Salzgehaltes auf die unspezifischen Dissoziationskonstanten kann hierbei ausgeschlossen werden, da alle Experimente bei einem pH-Wert von 7.5 und einem Salzgehalt im Bereich von 10 mM bis 100 mM durchgeführt wurden.^[72, 75, 96] Eine mögliche Ursache für die geringeren unspezifischen Dissoziationskonstanten könnten verschiedene verwendete Gelelektrophorese-Aparaturen sein. Im Verlauf der Bindungsexperimente kann sich bei nicht ausreichend von Puffer umgebenen Gelen der pH-Wert des Gelsystems erniedrigen und somit in einer eventuellen Abnahme der Bindungsaktivität des Reparaturenzyms, sowie in einer weiteren Protonierung der mit dem Enzym interagierenden Phosphatgruppen resultieren.

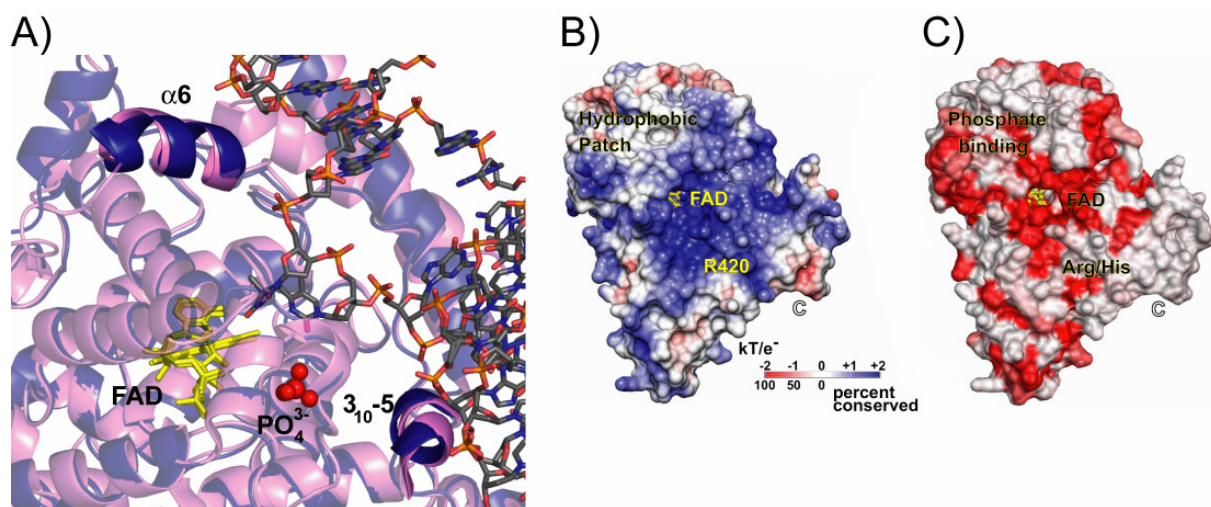
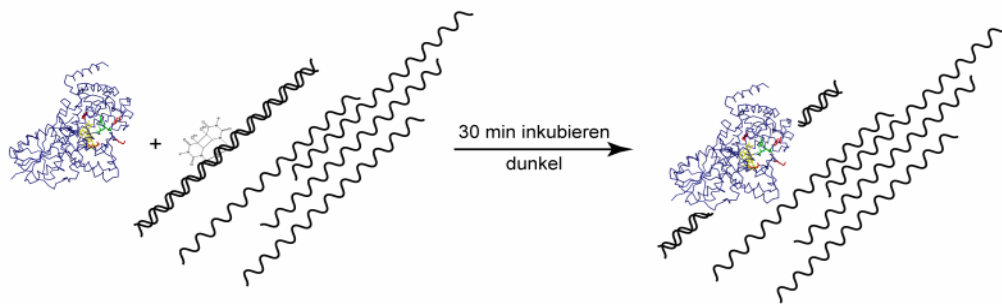


Abbildung 5.16: Phosphatbindungsstelle der *A. thaliana* (6-4)-Photolyase (PDB ID: 3FY4). A) Superposition des *A. thaliana* (6-4)-Enzyms (rosa) mit dem *D. melanogaster* (6-4)-Photolyase/ (6-4)-DNA-Komplex (blau) (PDB ID: 3CVV). Dargestellt ist die Orientierung des Phosphations (rote Sphären) zum (6-4)-Schaden, den beiden mit der großen, sowie kleinen Furche interagierenden α -Helices und dem katalytischem FAD-Kofaktor (gelb). B) Oberflächendarstellung des elektrostatischen Potentials, welche die positiv geladene DNA-Bindungs tasche zeigt und C) Präsentation der konservierten (6-4)/ *clock*-Cluster mit der Position des Phosphatbindungsmotiv.^[85]

Zusätzlich scheint das für die *A. thaliana* (6-4)-Photolyase postulierte Phosphatbindungsmotiv nicht nur wie zuvor angenommen nur das (6-4)-Bindungsverhalten zu steuern, sondern auch möglicherweise die Affinität zu ungeschädigter DNA zu erhöhen. Dieses die Substratbindungsstelle umgebende Phosphatbindungsmotiv steuert eine zusätzliche positive Ladung bei, generiert einen hydrophoben Bereich und kann auf diese Weise die unspezifischen Wechselwirkungen zur DNA verstärken (Abb. 5.16).^[85]

Ein im doppelsträngigem Oligonukleotid enthaltener CPD-Schaden wurde wie erwartet nicht spezifisch von der Photolyase erkannt, behinderte andererseits aber auch den Bindevorgang an die DNA nicht. Dies konnte anhand von Dissoziationskonstanten in derselben Größenordnung wie für die Bindung an das ungeschädigte Oligonukleotid gezeigt werden.

A) Spezifische Bindung an den CPD-Schaden



B) Unspezifische Bindung an ungeschädigte DNA

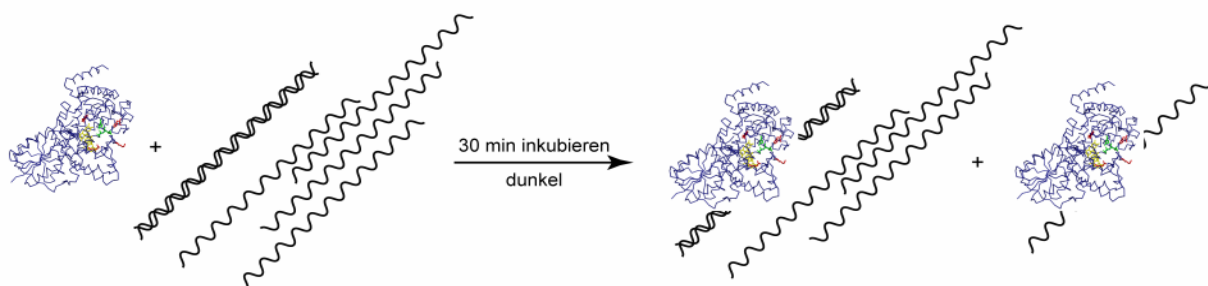


Abbildung 5.17: Schematische Darstellung der Bindungsexperimente. A) Spezifische Bindung an den CPD-Schaden. In diesem Fall binden die Oberflächenmutanten der *A. thaliana* (6-4)-Photolyase überwiegend an das geschädigte Oligonukleotid. B) Bei der unspezifischen Bindung, können die Oberflächenmutanten statistisch entsprechend ihrer Dissoziationskonstanten sowohl an die einzelsträngige als auch an die doppelsträngige ungeschädigte DNA binden.

Für eine bessere Vergleichbarkeit der nativen (6-4)-Photolyase mit ihren Oberflächenmutanten wurde jedoch die Art der Bindungsstudien abgewandelt (Abb. 5.17). In diesen Bindungsstudien, unter Verwendung von einzelsträngiger DNA als Kompetitor, konnten diese Ergebnisse reproduziert werden. Weitere Untersuchungen unter Verwendung der Oberflächenmutanten der *A. thaliana* (6-4)-Photolyase lieferten andererseits nicht die erwarteten Resultate, sondern zeigten ein verstärkte unspezifische Bindung. Die Ursache

hierfür ist offensichtlich in einer mutationsbedingten Veränderung der unspezifischen Dissoziationskonstanten zu finden. Demnach scheinen die Photolyasemutanten eine erhöhte spezifische Affinität für doppelsträngige DNA im Vergleich zu einzelsträngiger DNA aufzuweisen, die gleichzeitig eine eventuell vorliegende spezifische Erkennung des CPD-Schadens überlagert. Trotz der Überlagerung konnte eine geringe Zunahme der CPD-Bindungsaffinität für die K246R, H364N_L365R und W408Y Mutanten beobachtet werden. Demnach scheint das Einfügen der hochkonservierten, an der Bindung und Reparatur des CPD-Schadens beteiligten Asparagin und Argininreste in der *A. thaliana* (6-4)-Photolyase die Erkennung des CPD-Schadens geringfügig zu fördern. Im Falle der K246R-Mutante könnte das eingefügte Arginin 246 die Bindungsaffinität des CPD-Schadens durch seine Interaktion mit seinem 5'-Thymin erhöhen.^[65, 66] In der H364N_L365R Mutante hingegen kann einerseits das eingefügte Asparagin eine Wasserstoffbrücke zu den C4-Carbonyl- und N3-Imidgruppen des CPD 3'-Thymins ausbilden und andererseits das Asparagin über eine Salzbrücke mit dem P⁺1 Phosphat des Thymindimers interagieren. Interessanterweise konnte eine weitere Zunahme der Affinität des CPD-Schadens für keine der beiden Dreifachmutanten dokumentiert werden. Demnach scheint möglicherweise ein durch das Einfügen eines weiteren Methionins oder Glutamins auftretender Vorteil wieder durch die Entfernung des zweiten Histidins 368 aufgehoben zu werden. Sowohl die K246R als auch die H364N_L365R Mutante der *A. thaliana* (6-4)-Photolyase beinhalten Modifikationen, die ihr DNA-Bindungsverhalten sowohl in Richtung der *A. nidulans* CPD-Photolyase als auch in Richtung *A. thaliana* DASH Cryptochrom 3 verändern.^[65, 66] Interessant ist, dass die Modifikation der dritten Mutante ausschließlich in Richtung DASH Cryptochrom verläuft. In DASH Cryptochromen dreht sich der Tyrosinrest um 70 ° und ermöglicht so die Einbettung des CPD-Schadens über hydrophobe Wechselwirkungen.^[66] Da jedoch auch in (6-4)-Photolyasen der native Tryptophanrest zur Seite flippt, könnte der tatsächliche Vorteil des Tyrosins sterischer Natur zu sein.

Um jedoch diese Ergebnisse zu bestätigen, sollten analog zum nativen Enzym auch für die Oberflächenmutanten der *A. thaliana* (6-4)-Photolyase die einzelnen Dissoziationskonstanten unter Verwendung von ungeschädigtem doppel- und einzelsträngigem Oligonukleotid, sowie in Gegenwart von CPD-haltiger DNA bestimmt werden. Zusätzlich sollte das Protokoll für die Aufreinigung der Q298E Mutante weiter optimiert werden, so dass wenigstens geringe Mengen dieser *A. thaliana* (6-4)-Photolyasevariante auf die spezifische Bindung des CPD-Schadens untersucht werden könnten. In CPD-Photolyasen stabilisiert dieses eingefügte Glutamat (*A. nidulans* CPD-Photolyase: Glu 283) über die Ausbildung einer

Wasserstoffbrücke zum O4-Sauerstoff des 5'-Thymins gemeinsam mit einem Asparaginrest (N349) den CPD-Schaden.^[103]

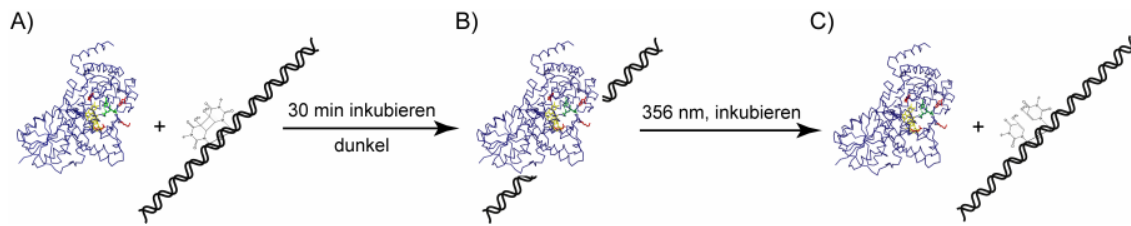


Abbildung 5.18: Schematische Darstellung über den Ablauf des Reparaturassays. A) Oberflächenmutante der *A. thaliana* (6-4)-Photolyase zu Beginn des Assays, B) nach einer 30 minütigen Inkubation kann das (6-4)-Enzym das geschädigte Oligonukleotid binden und C) nach Belichtung bei 356 nm kann die Photolyase den CPD-Schaden reparieren.

Der in Abb. 5.18 dargestellte Reparaturassay zeigte, dass keine der aufgereinigten *A. thaliana* (6-4)-Photolyasemutanten die für die Reparatur des CPD-Schadens essentiellen Wechselwirkungen aufweist. Demnach waren alle Oberflächenmutanten nicht in der Lage den CPD-Schaden, sowohl in doppelsträngiger als auch in den eine Loopstruktur enthaltenen Oligonukleotiden, zu reparieren. Daher scheint in der *A. thaliana* (6-4)-Photolyase selbst in beiden Dreifachmutanten das Einfügen der Asparagin-, Arginin- und Methionin, bzw. des Glutaminrestes nicht die für die CPD-Reparatur benötigten Wechselwirkungen zur Verfügung zu stellen. Somit gelang es nicht die *A. thaliana* (6-4)-Photolyase in den CPD-Photolyase Subtyp zu konvertieren. Aus diesem Grund scheinen die Unterschiede zwischen den beiden Photolyasesubtypen diffiziler als im Fall der BLUF-Domänen enthaltenden Proteine zu sein (Abschnitt 5.1). Diese distinkten Unterschiede für die mangelnde Aktivität des in Richtung des CPD-Subtyps veränderten pflanzlichen (6-4)-Enzyms können hierbei sowohl in der DNA-Bindungstasche als auch im Bindungsverhalten der (6-4)- und CPD-Photolyasen zur intakten B-DNA liegen.

5.2.3. Unterschiede in der Erkennung bzw. Reparatur zwischen (6-4)- und CPD-Photolyasen

5.2.3.1. Unterschiede in der DNA-Bindungstasche

Die strukturellen Details im aktiven Zentrum können eine mögliche Erklärung für die Spezifität beider DNA-Reparaturenzyme für das jeweilige Photoprodukt liefern. Die

Unterschiede in der Erkennung, Bindung und Reparatur von (6-4)-Schäden durch (6-4)-DNA-Photolyasen und CPD-Schäden durch CPD-Photolyasen bzw. DASH Cryptochrome liegen auf der Aminosäureebene und hauptsächlich im Bindungsbereich des Pyrimidindimers. Salzbrücken zu den Phosphaten der DNA-Basen werden in beiden Photolyasen über ähnliche Aminosäuretypen und in ähnlicher Anzahl ausgebildet. Als relevanter Unterschied ist die Salzbrücke vom Arginin 420 (*D. melanogaster* (6-4)-Photolyase: Arg421) zum P^0 -Phosphat zwischen (6-4)-Enzymen und ihrem DNA-Schaden zu nennen, die im CPD-Photolyase/ CPD-Oligonukleotid-Komplex nicht beobachtet wird.^[103, 104] Dieses Arginin 420 befindet sich auf einem Loop, welcher die Lücke zwischen den (6-4)-Pyrimidinen und den gegenüberliegenden Basen ausfüllt und somit den Photolyase/ DNA- Komplex ähnlich dem CPD-Enzym stabilisiert. In (6-4)-Photolyasen ragt dieser Loop jedoch weiter in die Lücke des geschädigten DNA-Stranges hinein und bringt so den Argininrest 420 in direkte Nähe zum P^0 -Phosphatrest des (6-4)-Schadens (Abb. 5.19).

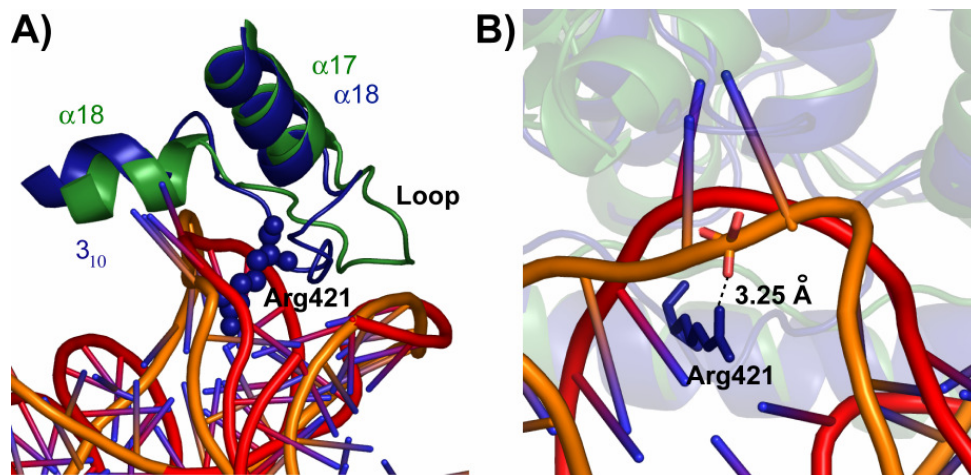


Abbildung 5.19. Superposition des *D. melanogaster* (6-4)-Photolyase/ (6-4)-DNA-Komplex (blau/ orange) (PDB ID: 3CVV) und des *A. nidulans* CPD-Photolyase/ CPD-DNA-Komplex (grün/ rot) (PDB ID: 1TEZ). A) Darstellung des zur Stabilisierung des Photolyase/ DNA Komplex in die deformierte geschädigte DNA eingelagerten Loops. Hierbei ist deutlich zu erkennen, dass der Loop des (6-4)-Enzyms weiter in die deformierte DNA hineinreicht und den Argininrest 421 (blaue Sphären) in die direkte Nähe zum P^0 -Phosphat bringt. B) Position und Abstand des Argininrestes 421 (blau) zum P^0 -Phosphat.

Im Bereich des Pyrimidindimers bildet in (6-4)-Photolyasen das Histidin 364 eine Wasserstoffbrücke zur C5-Hydroxylgruppe und das Glutamin 298 eine Wasserstoffbrücke zu den N3- und O2-Atomen des 3'-Pyrimidins aus. Im Verlauf des Reparaturmechanismus protoniert das hochkonservierte Histidin 364 die C5-OH-Gruppe des durch Elektronentransfer

entstandenen 3'-Pyrimidinradikalanions, so dass dieses ein Wassermolekül als Abgangsgruppe abspaltet, während es gleichzeitig durch ein zweites Histidin 368 stabilisiert wird.^[104] Jedoch wird das 5'-Pyrimidin in (6-4)-Photolyasen lediglich über hydrophobe Wechselwirkungen stabilisiert, von denen zwei konservierte Tryptophanreste, die während des Reparaturmechanismus generierte hochreaktive Radikalanionspezies abschirmen.^[104] In CPD-Photolyasen und DASH Cryptochromen hingegen werden diese hydrophoben Wechselwirkungen durch Arginin 232 und Glutamat 283, das einerseits Wasserstoffbrücken zum O4-Sauerstoff des 5'-Pyrimidins ausbildet, verstärkt.^[103, 117] Der Glutamatrest 283 verhindert durch Protonierung des 5'-Pyrimidins einen möglichen Rückelektronentransfer vom CPD-Schaden auf das FAD, so dass das Pyrimidindimer erfolgreich gespalten werden kann.^[73] Dies ist im aktiven Zentrum der größte strukturelle Unterschied im Verlauf beider Bindungs- und Reparaturprozesse. Neben dem 5'- wird das 3'-Pyrimidin durch Wasserstoffbrücken vom Asparagin 349 und Methionin 353 bzw. Glutamin in DASH Cryptochromen stabilisiert (Abb. 5.20).

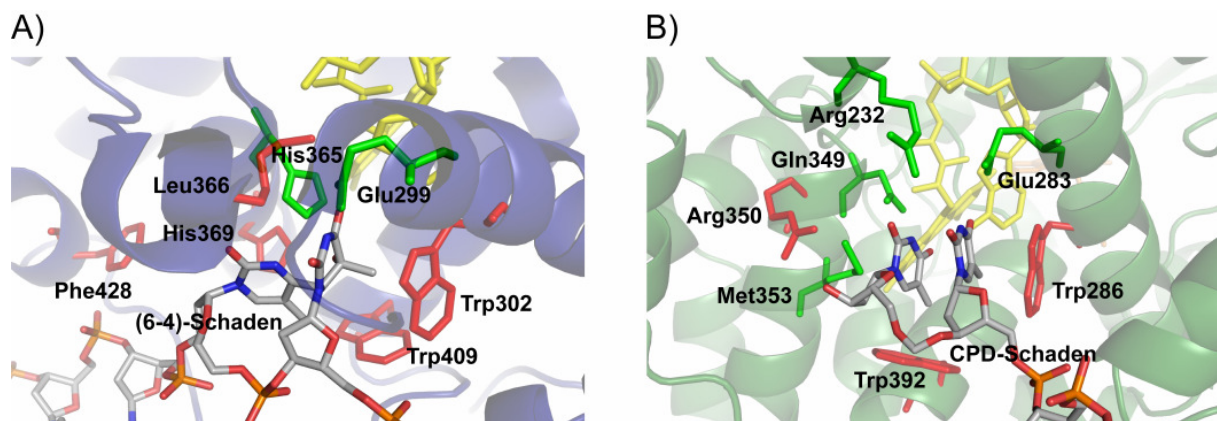


Abbildung 5.20: DNA-Bindungstaschen A) *D. melanogaster* (6-4)-Photolyase (PDB ID: 3CVV) und B) *A. nidulans* CPD-Photolyase (PDB ID: 1TEZ). Dargestellt sind der jeweilige Photoschaden (grau), die für die Erkennung und Reparatur des jeweiligen Schadens selektierenden Aminosäuren (grün) und an der Bindung des DNA-Schadens beteiligte Reste (rot).

Dies zeigt eine der möglichen Ursachen für die mangelnde Reparaturaktivität beider Dreifachmutanten auf. Diese enthalten zwar die im Verlauf der CPD-Reparatur das 3'-Thymin stabilisierenden Asparagin-, Methionin-, bzw. Glutaminreste, sowie den eine Salzbrücke zum P^{+1} Phosphat ausbildenden Argininrest, jedoch nicht das mit dem 5'-Pyrimidin interagierende und das Radikalanion stabilisierende Glutamat.

5.2.3.2. Unterschiede im DNA-Bindungsmodus

Neben den strukturellen Feinheiten im aktiven Zentrum können auch distinkte Unterschiede im DNA-Bindungsmodus der (6-4)- und CPD-Photolyasen zur intakten B-DNA die Ursache für die mangelnde Aktivität des konvertierten pflanzlichen (6-4)-Enzyms sein. Zur Aufzeigung dieser Charakteristika beider Photolyasesubtypen wurden die DNA-Bindung und Wechselwirkung auf Sekundär- und Tertiärstrukturebene, der Biegungs- und Deformierungsgrad der gebundenen geschädigten DNA, sowie der Abstand der Phosphatreste des geschädigten DNA-Stranges verglichen.

CPD-Photolyasen erkennen den CPD-Schaden und flippen diesen im Verlauf des Bindungsprozesses in ihr aktives Zentrum. Hierbei vergrößert sich der durch den CPD-Schaden induzierte Knick von 20 bis 30 ° auf ~ 50 °.^[102, 103] Im Gegensatz dazu bewirkt die Bindung der (6-4)-Photolyasen, durch das Hineinflippen des Photoschadens in ihr aktives Zentrum, keine Vergrößerung des durch den (6-4)-Schaden verursachten Knicks um 44 °. Dies konnte anhand eines gleich bleibenden Biegungswinkels im (6-4)-Photolyase/(6-4)-Schaden-Komplex im Bezug auf die ungebundene DNA dokumentiert werden (Abb. 5.21A).^[196] Demnach scheinen in beiden Photolyasesubtypen unterschiedliche Flippmechanismen im Verlauf der DNA-Bindung abzulaufen. Ein alleiniger Effekt auf das DNA-Bindungsverhalten konnte jedoch anhand von negativen Resultaten der Reparaturassays unter Verwendung von loopstrukturierten CPD-geschädigten Oligonukleotiden ausgeschlossen werden. Diese Oligonukleotide sollten in den *A. thaliana* (6-4)-Photolyasemutanten ähnlich dem *A. thaliana* DASH Cryptochrom 3 das Hineinflippen in die DNA-Bindungstasche erleichtern.^[117]

Des Weiteren wurde beobachtet, dass der gebundene CPD-haltige DNA-Doppelstrang sehr viel stärker deformiert ist als der den (6-4)-Schaden enthaltene Doppelstrang (Abb. 5.21B). Dieser unterschiedliche Grad der Verformung der geschädigten DNA spiegelt sich auch in den Abständen benachbarter Phosphatreste des geschädigten DNA-Stranges wieder. Hierbei konnte im Fall einer CPD-Schädigung eine deutliche Reduzierung der P^0 und P^{+1} (6.1 Å), sowie der P^{+1} und P^{+2} (6.1 Å) Abstände dokumentiert werden. Im Gegensatz dazu wurde induziert durch den (6-4)-Schaden eine deutlichere Verringerung jedoch nur des P^0 und P^{+1} Abstandes (5.1 Å) beobachtet. Demnach scheint die Ausbildung des CPD-Schadens eine größere Labilität in dem ihn umgebenen Bereich zu bewirken als die Generierung des (6-4)-Photoproduktes. Dieser Effekt könnte begründen, warum beide DNA-Reparaturenzyme die geschädigte DNA über unterschiedliche Flippmechanismen binden.

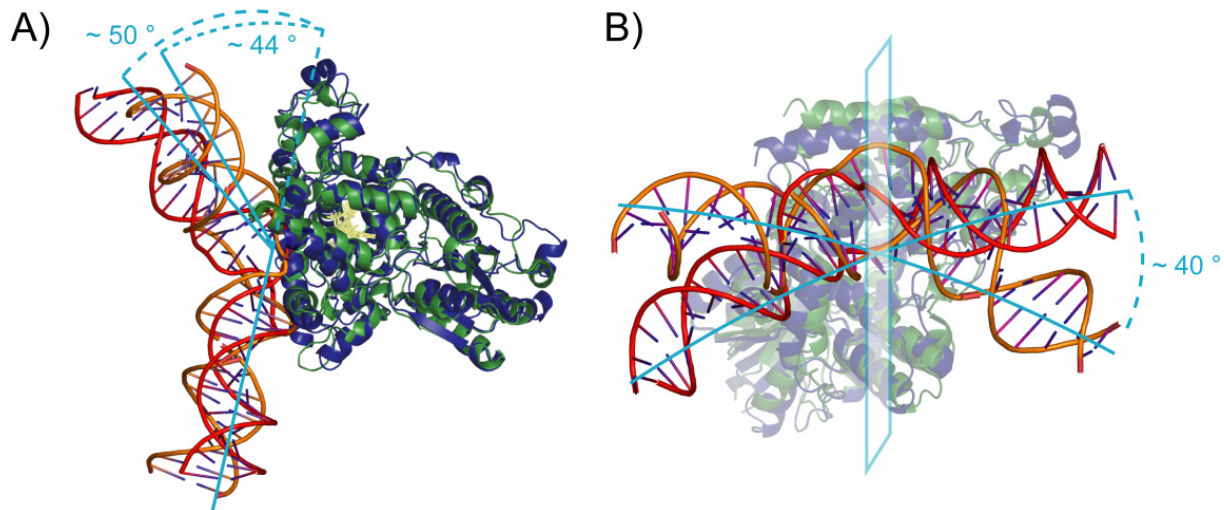


Abbildung 5.21: Superposition der *D. melanogaster* (6-4)-Photolyase (blau/ orange) (PDB ID: 3CVV) und *A. nidulans* CPD-Photolyase (grün/ rot) (PDB ID: 1TEZ) im Komplex mit dem den jeweiligen DNA-Schaden enthaltenden Oligonukleotid. A) Darstellung der nach Bindung des jeweiligen DNA-Schadens beobachteten Bieigungsgrade des DNA-Doppelstranges und B) der unterschiedlichen Ausrichtungen der gebundenen, geschädigten DNA.

Phosphatreste CPD	Abstand in Å	Phosphatreste (6-4)	Abstand in Å
+3 bis +2	7.1	+3 bis +2	6.5
+2 bis +1	6.1	+2 bis +1	6.9
+1 bis 0	6.1	+1 bis 0	5.1
0 bis -1	6.3	0 bis -1	6.2
1- bis -2	6.4	1- bis -2	6.3
-2 bis -3	6.6	-2 bis -3	6.9
-3 bis -4	7.0	-3 bis -4	6.4

Tabelle 5.1: Auflistung der Abstände der den jeweiligen DNA-Photoschaden umgebenden Phosphatreste der an die Photolyasen gebundenen Oligonukleotide.

Zusätzlich zum unterschiedlichen Deformierungsgrad der an den jeweiligen Photolyasesubtyp gebundenen, geschädigten DNA-Doppelstränge konnte eine unterschiedliche Orientierung beider Oligonukleotide beobachtet werden. Die Überlagerung der Strukturen des CPD-Photolyase/ CPD-DNA- und des (6-4)-Photolyase/ (6-4)-DNA-Komplexes zeigte auf, dass die geschädigten Oligonukleotide um einen Winkel von ca. 40° divergieren (Abb.5.21B). Diese Beobachtung präsentiert einen weiteren Unterschied im DNA-

Bindungsverhalten der CPD- und (6-4)-Photolyasen. Die Kombination des für (6-4)-DNA-Photolyasen veränderten Flippmechanismus und der weniger ausgeprägten Deformierung der (6-4)-geschädigten DNA können möglicherweise als Erklärung für die hohe Bindungsaffinität des pflanzlichen (6-4)-Enzyms dienen, welches mit sehr geringen Dissoziationskonstanten an ungeschädigte DNA bindet. Hierbei könnte die *A. thaliana* (6-4)-Photolyase über einen 1-D-Diffusionsmechanismus an ungeschädigte DNA binden und diese auf der Suche nach (6-4)-Schäden abfahren. Die durch den (6-4)-Schaden induzierte Deformierung der DNA, sowie der Knick stoppen das (6-4)-Enzym, so dass dieses den DNA-Schaden in sein aktives Zentrum flippen kann. Im Gegensatz dazu scheinen aufgrund der hohen unspezifischen Bindungskonstanten CPD-Photolyasen bevorzugt über einen 3-D-Diffusionsmechanismus direkt an den CPD-Schaden zu binden, die DNA stärker zu Verbiegen und das Pyrimidindimer in ihre DNA-Bindungstasche hineinzuflippen.

Diese Überlagerung beider Photolyase-DNA-Komplexe zeigte auch, eine ähnliche elektrostatische Stabilisierung der DNA durch zwei an die große und kleine Furche des geschädigten DNA-Dopplestranges angelagerte α -Helices. Hierbei verwendet das (6-4)-Enzym für die Interaktion mit der großen Furche lediglich eine 3_{10} -Helix anstelle der im CPD-Enzym vorliegenden $\alpha 18$ -Helix (Abb5.22).

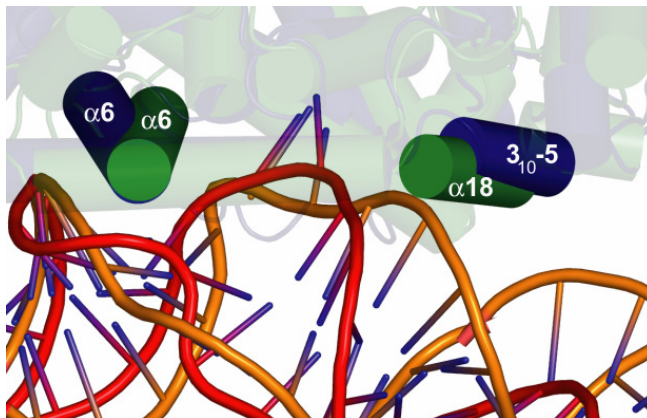


Abbildung 5.22: Darstellung der beiden an die kleine (links) und große (rechts) Furche angelagerten α -Helices. Die Superposition der *D. melanogaster* (6-4)-Photolyase (blau/orange) (PDB ID: 3CVV) und *A. nidulans* CPD-Photolyase (grün/rot) (PDB ID: 1TEZ) im Komplex mit dem den jeweiligen DNA-Schaden enthaltenden Oligonukleotid zeigt lediglich geringe Unterschiede in der Positionierung beider Helices.

Diese Resultate zeigen, dass die Neuprogrammierung einer Photolyase vom (6-4)- in den CPD I-Subtyp nicht durch Austauschen verschiedener Aminosäurereste der DNA-Bindungstasche zu bewirken ist, da wie gezeigt weitere Unterschiede für die Bindung des jeweiligen DNA-Schadens zwischen beiden DNA-Reparaturenzymen existieren. Diese zusätzlichen distinkten Charakteristika des DNA-Bindungsverhalten verdeutlichen die großen Sequenzunterschiede zwischen CPD- und (6-4)-Photolyasen. Demnach wäre die Konversion eines tierischen Cryptochroms in eine (6-4)-Photolyase wahrscheinlicher, da beide über eine

Sequenzidentität von bis zu 50 % verfügen und demnach auch evolutionär stärker verwandt als die beiden Photolyasesubtypen sind (Abb. 5.13).

5.3. Analyse photoinduzierter struktureller Änderungen in der *D. salina* (6-4)-Photolyase

Die Verknüpfung sowohl der Photolyase- als auch der Cryptochrom-Aktivität konnte bisher für das *Aspergillus nidulans* Cryptochrom A und das *Phaeodactylum tricornutum* Enzym festgestellt werden.^[191, 197] Hierbei vereint das *A. nidulans* Cryptochrom A die CPD-Photolyaseaktivität und die lichtabhängige Entwicklung des Pilzes, einschließlich der negativen Regulation des Fortpflanzungsprozesses.^[191] Das *P. tricornutum* Enzym hingegen verfügt über eine (6-4)-Reparaturaktivität und ist in der Lage, als transkriptioneller Repressor der zirkadianen Uhr zu agieren.^[197]

Da (6-4)-Photolyasen eine extrem hohe Sequenzidentität zu tierischen Cryptochromen aufweisen, wurde am Beispiel der *D. salina* (6-4)-Photolyase, welche eine extrem lange C-terminale α -helikale Extension besitzt, unter Verwendung photometrischer Methoden überprüft, ob diese blaulichtinduzierte strukturelle Veränderungen aufzeigt. Diese C-terminale α -helikale Extension könnte das *D. salina* (6-4)-Enzym eventuell eine zweite den Cryptochromen ähnliche Funktion besitzen und mit einem Signaltransduktionspartner interagieren. Des Weiteren wurde das unspezifische DNA-Bindungsverhalten in Abhängigkeit vom Redoxzustand des katalytischen FAD-Kofaktors betrachtet und die erhaltenen Daten mit zuvor untersuchten Photolyasen und Cryptochromen verglichen. Abschließend soll ein Mechanismus, bezogen auf die funktionellen Eigenschaften, vorgestellt und diskutiert werden.

5.3.1. Allgemeine Eigenschaften der rekombinanten *D. salina* (6-4)-Photolyase

Die lichtgeschützt aufgereinigte monomere *D. salina* (6-4)-Photolyase enthielt wie die zuvor aufgereinigten *A. thaliana* und die *X. laevis* (6-4)-Photolyasen den katalytischen FAD-Kofaktor in stöchiometrischen Mengen.^[75] Im Gegensatz dazu wurde bei der ebenfalls aus einem einzelligen Organismus stammenden *O. tauri* (6-4)-Photolyase lediglich eine Besetzung von 64 % FAD festgestellt.^[194] Der katalytische Kofaktor lag in der aufgereinigten *D. salina* (6-4)-Photolyase auch nach zweitägiger Dunkeladaption noch in einer Mischung aus oxidiertem und neutralem semichinoidem Zustand vor. Dieses gleichzeitige Vorliegen verschiedener FAD-Zustände wurde ebenso für die aufgereinigten *O. tauri* und *X. laevis*

(6-4)-Photolyasen, sowie für die *T. thermophilus* und *S. typhimurium* CPD-Photolyasen gezeigt.^[75, 173, 174, 194] Des Weiteren konnte neben dem katalytischem FAD-Kofaktor in der *D. salina* (6-4)-Photolyase ähnlich den zuvor für rekombinant produzierten *X. laevis*, *A. thaliana*, *O. tauri* (6-4)-Photolyasen und der *T. thermophilus* CPD-Klasse I, sowie der *A. thaliana* CPD-Klasse II Photolyase, kein Antennenchromophor detektiert werden.^[75, 149, 173, 193, 194] Ein eventuell gebundener MTHF-Kofaktor könnte hierbei im Verlaufe der Aufreinigung vom Reparaturenzym abdissoziiert sein, während 8-HDF nicht in *E. coli* produziert wird und somit auch nicht in die (6-4)-Photolyase eingebaut werden konnte.

5.3.2. Photochemische Eigenschaften der *D. salina* (6-4)-Photolyase

Das gemessene UV/VIS-Spektrum der oxidierten *D. salina* (6-4)-Photolyase ähnelt ebenfalls dem der *X. laevis*, *A. thaliana* und *O. tauri* (6-4)-Photolyasen.^[49, 51, 54, 67] Im Vergleich zur rekonstituierten *E. coli* CPD-Photolyase konnte für das *D. salina* (6-4)-Enzym eine Rotverschiebung des Absorptionsmaximums bei 378 nm um 4 nm und eine Blauverschiebung der Maxima bei 450 und 474 nm um 7 nm beobachtet werden,^[198] während zur *A. thaliana* CPD II Photolyase das gesamte Absorptionsspektrum (6-4)-Photolyase um 2 bis 5 nm rotverschoben ist.^[199] Demnach scheint neben den *A. thaliana* und *O. tauri* (6-4)-Photolyasen auch im *D. salina* Enzym die FAD-Bindungstasche im Vergleich zu CPD-Photolyasen weniger polar zu sein. Dies wurde für die *A. thaliana* (6-4)-Photolyase anhand von UV/VIS- und IR-Spektren bestimmt.^[109, 167]

Jedoch konnte der ausschließlich vorliegende oxidierte Zustand auch nach mehreren Tagen unter aeroben Bedingungen nicht erhalten, sondern nur unter Zugabe des Oxidationsmittels Kaliumhexacyanoferrat (III) unter Sicherheitslichtbedingungen generiert werden. Daher scheint in der *D. salina* (6-4)-Photolyase der neutrale semichinoide FAD-Zustand überaus stabil zu sein. Ein weiterer Aspekt, der für die Stabilisierung der neutralen FAD-Radikalform spricht, ist die blaulichtinduzierte quantitative Generierung derselbigen unter aeroben Bedingungen ohne Zugabe eines Reduktionsmittels. Der neutrale FAD-Radikalzustand konnte zuvor lediglich für die *A. thaliana* (6-4)-Photolyase durch Laserbestrahlung, jedoch nur unter anaeroben Bedingungen hergestellt werden.^[109] Im Gegensatz zu diesen beiden (6-4)-Photolyasen wurde der neutrale semichinoide FAD Zustand in den *X. laevis* (6-4)-und *T. thermophilus* CPD-Photolyasen entweder photoinduziert in Gegenwart eines Reduktionsmittels generiert oder konnte ähnlich der *O. tauri* (6-4)-Photolyase nur als Mischform mit dem oxidierten FAD Zustand erhalten werden.^[75, 174, 193, 194] Die Stabilisierung des neutralen semichinoiden FAD-Zustandes könnte in der *D. salina* (6-4)-Photolyase

einerseits durch den geringfügig erhöhten Schmelzpunkt im Vergleich zum oxidierten und vollständig reduzierten Zustand oder andererseits durch die Bindung eines Phosphations gefördert werden. Diese Phosphatbindungsstelle wurde in der Kristallstruktur der *A. thaliana* (6-4)-Photolyase beobachtet (Abschnitt 5.2; Abb.5.16). Hierbei können durch die Bindung eines Phosphations konformationelle Änderungen induziert werden, die wiederum neben dem DNA-Bindungsverhalten auch die FAD-Redox Eigenschaften beeinflussen könnten.^[85] Diese beobachtete Stabilisierung der neutralen semichinoiden *D. salina* (6-4)-Photolyase könnte ähnlich den pflanzlichen und tierischen Cryptochromen einen Signalzustand repräsentieren.
[125, 126]

Die Bildung dieser stabilen neutralen semichinoiden FAD-Form kann ähnlich der *O. tauri* (6-4)- und *E. coli* CPD-Photolyase, sowie dem *A. thaliana* Cryptochrom 1 und dem *D. rerio* DASH Cryptochrom ablaufen. Hierbei könnte ein durch Photoreduktion ausgebildetes anionisches FAD-Radikal entweder durch einen Protonentransfer vom Asparagin 439 oder vom Lösungsmittel stabilisiert werden, so dass eine direkte Autooxidation zum FAD inhibiert wird.
[92, 127, 194, 198, 200]

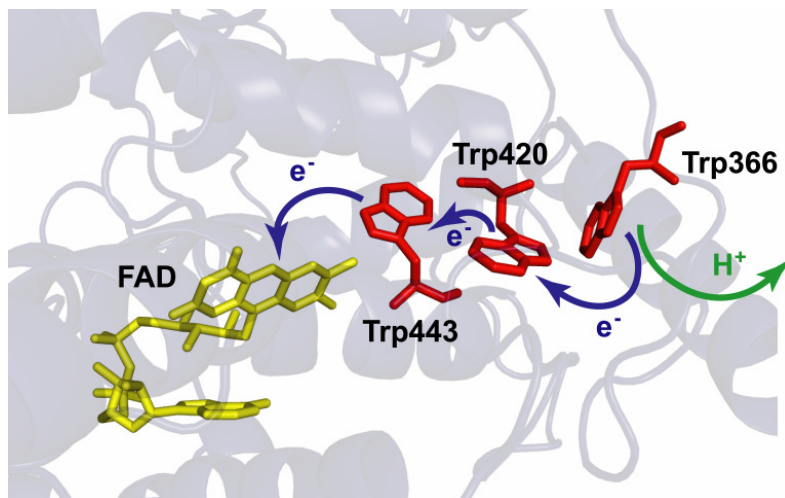


Abbildung 5.23: Elektronentransferweg der *D. salina* (6-4)-DNA-Photolyase. Das dargestellte 3D-Modell wurde anhand der Kristallstruktur der *A. thaliana* (6-4)-DNA-Photolyase (PDB ID: 3fy4B) mit dem Server SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) im *First Approach Mode* generiert.^[158] Dargestellt sind die am Elektronentransfer beteiligten Tryptophanreste (rot), das FAD (gelb), der Elektronentransferweg (blaue Pfeile) und die Protonenabgabe ans Lösungsmittel (grüner Pfeil).

Neben dem neutralen semichinoiden Zustand konnte auch die durch zwei Elektronen reduzierte FAD-Form erzeugt werden. Der vollständig reduzierte anionische FAD-Zustand konnte in der *D. salina* (6-4)-Photolyase wie im *X. laevis* (6-4)-Enzym durch

Weißlichtbestrahlung in Gegenwart von DTT unter aeroben Bedingungen hergestellt werden.^[75]

Die Generierung des halb- bzw. vollständig reduzierten Zustands der *D. salina* (6-4)-Photolyase durch Photoaktivierung zeigte, dass die für den Elektronentransfer benötigte Tryptophantriade auch in dem im einzelligen Organismus vorliegende Enzym katalytisch aktiv ist (Abb. 5.23). Somit abstrahiert auch in der *D. salina* (6-4)-Photolyase der durch Blaulichtbestrahlung generierte angeregte FAD-Zustand ein Elektron von einem ihm benachbarten Tryptophan 443. Dieses abstrahiert wiederum ein Elektron vom Tryptophan 420 und dieses von einem dem Lösungsmittel zugänglichen Tryptophan 366. Abschließend gibt das Tryptophan 366 seinerseits ein Proton an das umgebende Lösungsmittel ab.^[91]

5.3.3. Abhängigkeit des DNA-Bindungsverhalten vom Redoxzustand der (6-4)-Photolyase

Bislang konnte in CPD-Photolyasen keine Abhängigkeit der DNA-Bindung vom Redoxzustand beobachtet werden.^[98, 99] Das untersuchte *D. salina* (6-4)-Enzym zeigte *in vitro* im neutralen semichinoiden und im vollständig reduzierten Zustand lediglich ein leicht verbessertes unspezifisches Bindungsverhalten. Hierbei verringerten sich im Vergleich zum oxidierten Zustand die in Gegenwart von einzelsträngiger DNA bestimmten Dissoziationskonstanten leicht um den Faktor 2 und bei doppelsträngiger DNA um den Faktor 1.4. Demnach scheint die Photoaktivierung des katalytischen FAD-Kofaktors die Affinität zur ungeschädigten DNA nur geringfügig zu steigern oder die Abdissoziationsrate der DNA zu verringern. So könnte, wie für die *A. thaliana* (6-4)-Photolyase beschrieben, während der Photoaktivierung ein Phosphation an das (6-4)-Enzym binden und konformationelle Änderungen induzieren, welche z.B. die negative Ladung des vollständig reduzierten FAD-Kofaktors kompensieren.^[85] Die auf diese Weise leicht verringerten Dissoziationskonstanten könnten bewirken, dass das im vollständig reduzierten Zustand vorliegende *D. salina* (6-4)-Enzym besser an die DNA bindet, um diese nach zu reparierenden (6-4)-Schäden durch 1 D-Diffusion abzusuchen, ähnlich dem *A. thaliana* (6-4)-Enzym (Abschnitt 5.2.3.2). Die erkannten DNA-Schäden könnten dann relativ leicht von der Photolyase repariert werden.

Als weitere Gemeinsamkeit verbindet die *D. salina* und *A. thaliana* (6-4)-Photolyasen ihre geringen Dissoziationskonstanten in Gegenwart ungeschädigter Oligonukleotide, die um den Faktor 10^3 kleiner sind als zuvor dokumentierte Werte der *E. coli* CPD-Klasse I und

C. crescentus Klasse III Photolyasen.^[62, 64] Daher scheint im *D. salina* (6-4)-Enzym die Affinität zu ungeschädigter DNA auf ähnliche Weise wie im pflanzlichen (6-4)-Enzym erhöht zu sein (Abschnitt 5.2.2).

5.3.4. Lichtinduzierte strukturelle Änderungen in der *D. salina* (6-4)-Photolyase

Lichtinduzierte strukturelle Änderungen wurden zuvor für C-terminale α -helikale Extensionen von LOV-Domänen, BLUF-Domänen enthaltende Proteine und Cryptochromen beobachtet. Die α -helikalen C-Termini dieser Photorezeptoren sind an Signalübertragungen beteiligt.^[11, 23, 45, 122]

Die *D. salina* (6-4)-Photolyase weist im semichinoiden Zustand in einigen möglicherweise terminalen, α -helikalen Sekundärstrukturelementen Veränderungen im Vergleich zum oxidierten Zustand auf. Dies konnte anhand von CD-spektroskopischen Untersuchungen nach der lichtinduzierten Generierung des neutralen semichinoiden Zustands beobachtet werden. Im Fall der neutralen semichinoiden *D. salina* (6-4)-Photolyase zeigte ein im Bereich von 220 nm verringerter Circular dichroismus eine partielle Störung oder Entfaltung einiger α -helikaler Sekundärstrukturen. Diese lichtinduzierten Veränderungen könnten möglicherweise von einer in (6-4)-Photolyasen vorhandenen C-terminalen α -Helix stammen.^[85] Eine solche im neutralen semichinoiden *D. salina* (6-4)-Enzym beobachtete Veränderung der C-terminalen α -helikalen Extension könnte für eine mögliche Signalübertragung benötigt werden. Diese Signalübertragung könnte hierbei ähnlich dem *A. thaliana* Cryptochrom 1 ablaufen, bei dem sich lichtinduziert das STAESSS-Motiv der C-terminalen Region bewegt, um mit dem Signalpartner COP1 zu interagieren.^[77]

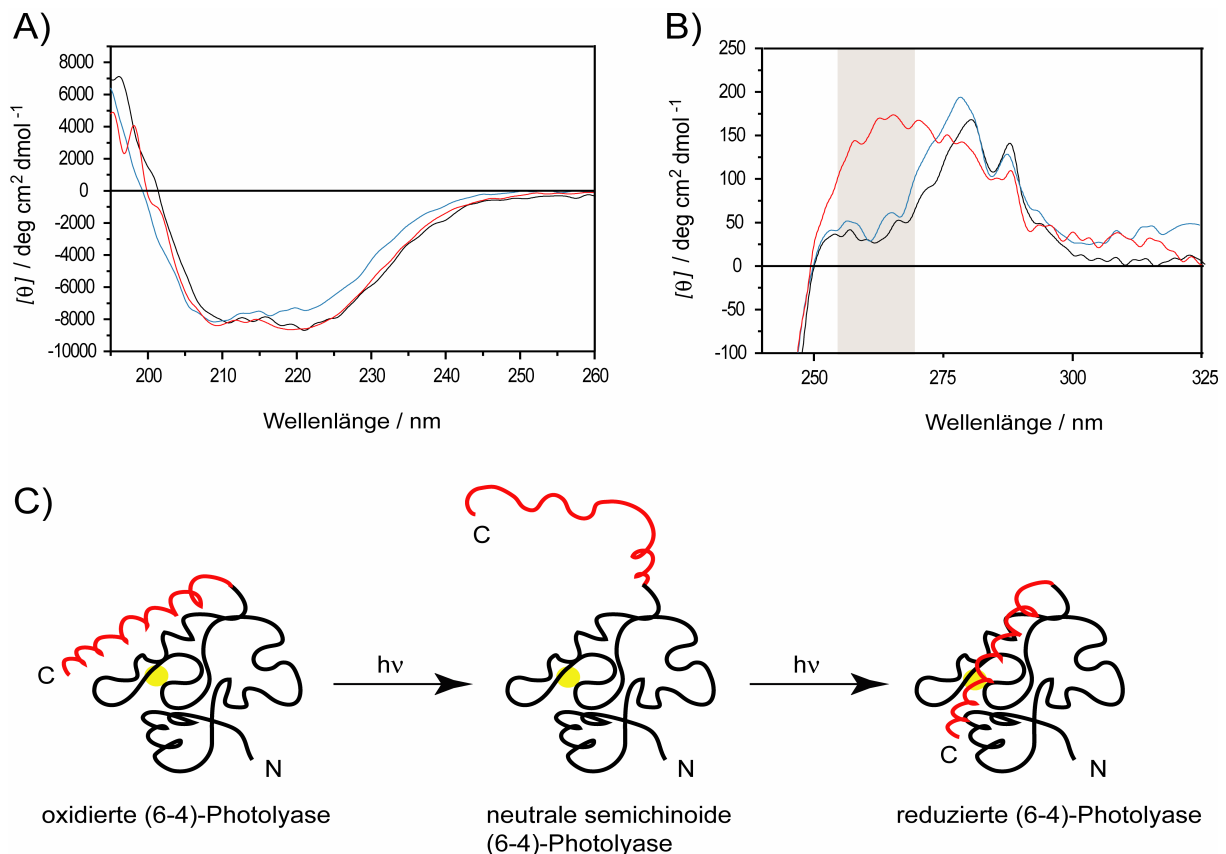


Abbildung 5.24: CD-Spektren und lichtinduzierte strukturelle Veränderungen der *D. salina* (6-4)-DNA-Photolyase. A) Fern-UV und B) nah-UV CD-Spektrum. Vollständig oxidierte Form (schwarz), neutrale semichinoide Form (türkis) und vollständig reduzierte Form (rot). C) schematische Darstellung der lichtinduzierten Bewegung der α -helikalen Extension. Gezeigt sind die Photolyaseregion (schwarz), die C-terminale α -Helix (rot) und der FAD-Kofaktor (gelb).

In der vollständig reduzierten (6-4)-Photolyase konnten jedoch diese Veränderungen nicht mehr detektiert werden. Demnach verfestigt sich die C-terminale α -helikale Extension nach weiterer Belichtung und Erzeugung der vollständig reduzierten katalytisch aktiven FAD-Form wieder. Während dieses Prozesses könnte die C-terminale α -Helix auch wieder an der ursprünglichen Position der Photolyaseregion oder an einer neuen Stelle anlagern. In dem durch zwei Elektronen reduziertem *D. salina* (6-4)-Enzym erscheint das Anlagern an eine neue Position der Photolyaseregion wahrscheinlicher, da der Adeninteil ihres katalytischen FAD-Kofaktors in diesem Zustand eventuell von einem benachbarten Tryptophanrest 388 verdeckt ist. Hierbei könnte diese zweite Umlagerung der C-terminalen α -Helix eine konformationelle Änderung des Tryptophan 388 bewirken. Dies zeigte ein erst für die vollständig reduzierte *D. salina* (6-4)-Photolyase beobachteter Circular dichroismus des Adenins bei 265 nm (Abb. 5.24).

5.3.5. Lichtinduzierter Mechanismus der *D. salina* (6-4)-Photolyase

Anhand der erhaltenen Resultate kann nun für die *D. salina* (6-4)-Photolyase der nachfolgend beschriebene funktionelle, lichtinduzierte Mechanismus vorgestellt werden. In der *D. salina* (6-4)-Photolyase wird durch Blaulicht der katalytische FAD-Kofaktor in den halbreduzierten Zustand überführt. Dies hat zur Folge, dass sich die C-terminale α -helikale Extension der Photolyase umlagert und sich die Affinität des (6-4)-Enzyms zur DNA geringfügig erhöht. Von diesem Zustand aus könnte die *D. salina* (6-4)-Photolyase bei weiterer Belichtung direkt den vollständig reduzierten FAD-Zustand ausbilden und über einen 1-D-Diffusionsmechanismus an die DNA binden, diese entlangfahren und vorhandene (6-4)-Schäden reparieren (Abb. 5.25A). Wird kein weiteres Photon durch den katalytischen FAD-Kofaktor absorbiert bestehen für das *D. salina* Enzym zwei alternative Mechanismen. Hierbei ist entscheidend, ob sich der Photorezeptor in DNA-Nähe oder in der Nähe zu einer potentiellen Effektoromäne befindet. Im ersten Fall kann die *D. salina* (6-4)-Photolyase entweder direkt über 1-D-Diffusion an die DNA binden, diese nach Schäden absuchen und bei diesen bis zur weiteren Belichtung verharren (Abb. 5.25B). Beim zweiten Fall kann das *D. salina* Enzym über seinen α -helikalen C-Terminus mit einer bisher noch nicht bekannten Effektoromäne wechselwirken und ein Signal auf diese übertragen. Diese Signalübertragung kann im *D. salina* Enzym durch Weißlicht unterbrochen werden, da nun die α -helikale Extension wieder an die Photolyaseregion anlagert (Abb. 5.25C). Ein ähnlicher lichtinduzierter Mechanismus konnte ebenso zuvor für Cryptochrome beobachtet werden, in denen der halbreduzierte Signalzustand durch Grünlicht deaktiviert werden kann und im Dunkeln wieder in den oxidierten Grundzustand konvertiert.^[69]

Wie die vorgestellten Resultate zeigen, scheint die *D. salina* (6-4)-DNA-Photolyase neben der (6-4)-DNA-Reparaturaktivität möglicherweise noch eine Cryptochromaktivität zu besitzen, ähnlich dem *P. tricornutum* Enzym und dem *A. nidulans* Cryptochrom A.^[191, 197] Hierbei könnte die *D. salina* (6-4)-Photolyase neben ihrer Photolyaseaktivität auch an der Magnetorezeption oder an der lichtabhängigen Synchronisation der zirkadianen Uhr beteiligt sein und somit eine Funktionalität der tierischen Cryptochrome besitzen. Eine Kombination dieser beiden Reaktivitäten ist denkbar, da in der Mikroalge *D. salina* bisher kein Cryptochrom identifiziert wurde. Das Vorhandensein dieses bifunktionalen Photorezeptors könnte demnach im Verlauf der Evolution ein wichtiger Faktor im Überleben der Mikroalge gewesen sein und eine weitere Schnittstelle zwischen Photolyasen und Cryptochromen repräsentieren.

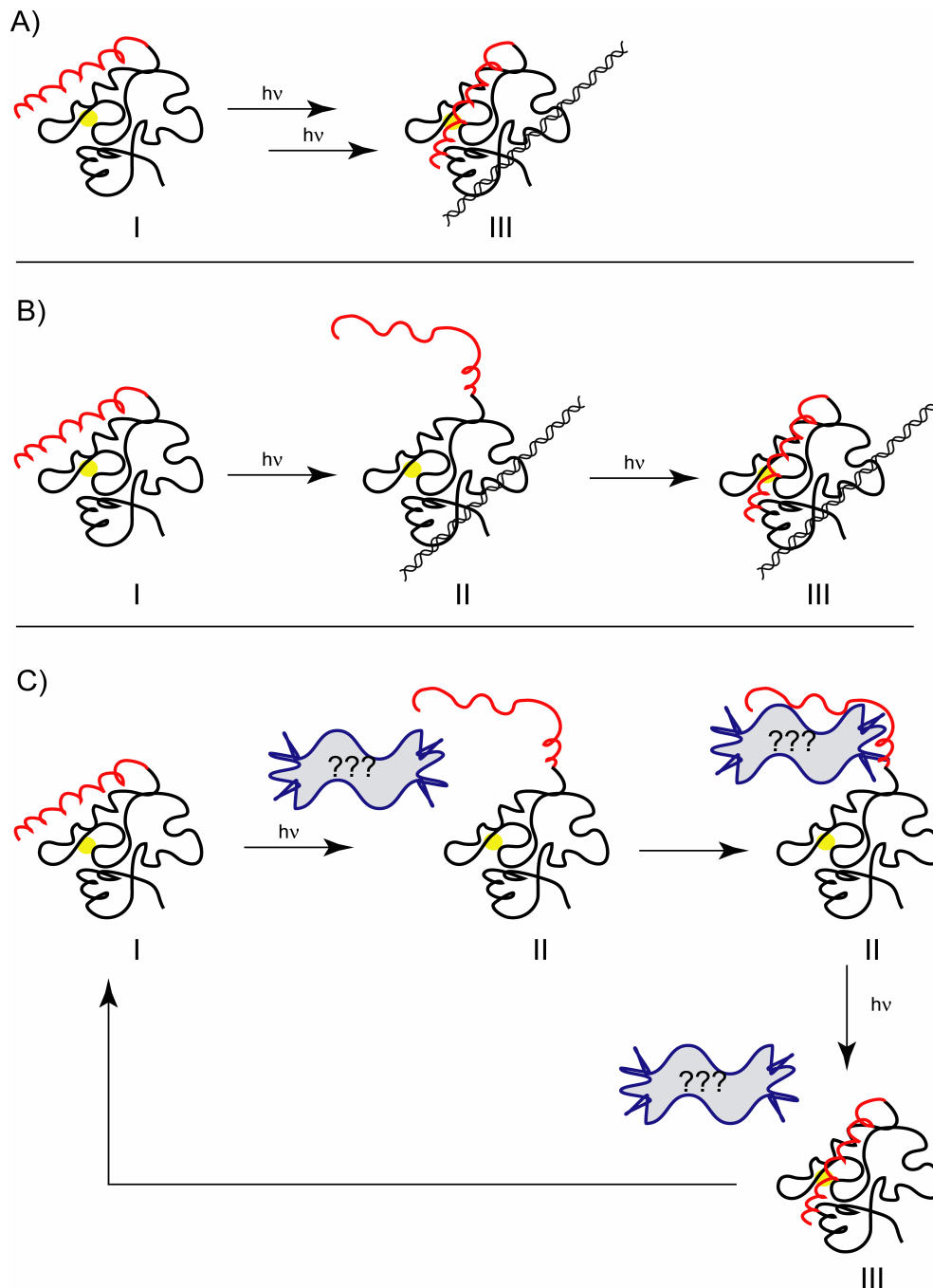


Abbildung 5.25: Schematische Darstellung der potentiellen lichtinduzierten Mechanismen der *D. salina* (6-4)-DNA-Photolyase. A) und B) Photolyasemechanismen. C) Cryptochrommechanismus. I. Oxidierte Photolyase, II. neutrale semichinoide Photolyase, III. vollständig reduzierte Photolyase. Gezeigt sind die Photolyaseregion (schwarz), die C-terminale α -Helix (rot), der FAD-Kofaktor (gelb) und ein bislang noch nicht identifizierter Interaktionspartner (blau).

5.4. Ausblick

Anhand der vorgestellten Resultate wurden im Verlauf dieser Arbeit die vorrangigen Unterschiede der *E. coli* YcgF BLUF-Domäne im Vergleich zu anderen zuvor untersuchten BLUF-Domänen enthaltenden Proteinen charakterisiert und der BLUF-Photorezeptor erfolgreich in den Subtyp II (SyPixD) umgewandelt. Zusätzlich konnte ein potentieller Photozyklus, sowie ein lichtinduzierter Signalübertragungsweg präsentiert werden. Zur Bestätigung dieser Hypothese sollten jedoch Mutanten des Glutamin-49 und Methioninrestes 92 der bakteriellen BLUF-Domäne generiert und aufgereinigt werden. Durch die photochemische Charakterisierung der Glutaminmutante der YcgF-(1-137) BLUF-Domäne könnte geklärt werden, ob die hochkonservierte Aminosäure auch in diesem Blaulichtrezeptor essentiell für den Photozyklus ist. Biophysikalische Untersuchungen der Methionin 92 Mutante würden helfen, die Rolle dieses Restes in der bakteriellen BLUF-Domäne bei der Signalübertragung zu analysieren. Hierbei könnten insbesondere NMR-spektroskopische Untersuchungen zeigen, ob die in der nativen BLUF-Domäne zu beobachtenden, lichtinduzierten, umfassenden strukturellen Änderungen nach wie vor vorhanden sind. Zusätzlich wäre eine NMR-spektroskopische Charakterisierung der M23I_A90W Mutante sinnvoll, um auch hier die prognostizierten globalen lichtinduzierten strukturellen Änderungen im Vergleich zum Wildtyp zu veranschaulichen.

Im Fall der *A. thaliana* (6-4)-Photolyase konnte gezeigt werden, dass die durch Mutagenese eingefügten Aminosäuren nicht ausreichen, um den (6-4)-Photolyasesubtyp in den CPD-Subtyp zu konvertieren und so eine CPD-Reparaturaktivität zu erzeugen. Ebenso wurde gezeigt, dass die distinkten Unterschiede beider DNA-Reparaturenzyme weit über die DNA-Bindungstasche hinausgehen und auch die Art des Flippmechanismus im Verlauf der DNA-Bindung, den Deformierungsgrad der geschädigten DNA, sowie die Orientierung der gebundenen DNA betreffen. Da sich (6-4)- und CPD-Photolyasen in ihrer Sequenz deutlich unterscheiden, könnte die Konversion eines tierischen Cryptochroms in eine (6-4)-Photolyase aufgrund einer Sequenzidentität von bis zu 50 % besser gelingen. Gleichzeitig könnte die erfolgreiche Konversion eines tierischen Cryptochroms in eine DNA-Photolyase zusätzlich den gemeinsamen evolutionären Ursprung der Photolyase/ Cryptochrom-Familie verdeutlichen.

Ebenso konnte veranschaulicht werden, dass die *D. salina* (6-4)-Photolyase für die Photoreaktivierung nicht essentielle blaulichtinduzierte strukturelle Veränderungen in der C-terminalen Region aufzeigt. Als Funktion dieser α -helikalen Veränderung wird die

Interaktion mit einem weiteren Signalpartner in Erwägung gezogen, ähnlich den Cryptochromen. Zur Identifizierung potentieller Interaktionspartner könnte die *D. salina* (6-4)-Photolyase homolog überproduziert werden. Die Expression der Photolyase sollte hierbei unter verschiedenen Lichtbedingungen durchgeführt werden, um eine Bindung des Enzyms an den Signalpartner zu gewährleisten. Nach dem Aufschluss könnte zunächst über Immunodetektion überprüft werden, ob ein Interaktionspartner existiert, der nach der Aufreinigung des Photolyase-Signalpartner-Komplexes unter Verwendung massenspektrometrischer Methoden identifiziert und anschließend kristallisiert werden kann.

6. Anhang

6.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Alleinstehende und komplexe BLUF-Domänen enthaltende Proteine. Gezeigt sind ebenfalls die verschiedenen Effektor-Domänen der komplexen BLUF-Photorezeptoren. 2	2
Abbildung 1.2: Kristallstrukturen zweier BLUF-Domänen. A) Dimer der <i>R. sphaeroides</i> AppA (PDB ID: 1YRX) und B) Monomer und C) Dekamer der <i>T. elongatus</i> TePixD BLUF-Domäne (PDB ID: 1XOP). Das AppA liegt sowohl in Lösung als auch in der Kristallstruktur als Dimer vor, während das TePixD in Lösung als Pentamer und Dekamer vorliegen kann, im Kristall jedoch nur das Dekamer beobachtet wird. ^[25, 26, 28] 3	3
Abbildung 1.3: Flavinbindungstaschen zweier BLUF-Domänen. A) <i>R. sphaeroides</i> AppA (PDB ID: 1YRX) und B) <i>T. elongatus</i> TePixD BLUF-Domäne (PDB ID: 1XOP). Die AppA Bindungstasche repräsentiert die W_{in} und die des TePixD die W_{out} Konformation. ^[25, 26] . 4	4
Abbildung 1.4: Photozyklen BLUF-Domänen enthaltender Proteine. A) Mechanismus über Drehung des Glutaminrestes 63 um 180° und B) Mechanismus einschließlich 180° Drehung und Tautomerisierung des Glutaminrestes 63. ^[37, 41] 6	6
Abbildung 1.5: NMR Spektren der mit FMN rekonstituierten <i>E. coli</i> YcgF-(1–137) BLUF-Domäne. A) ¹ H NMR- und B) ¹ H, ¹⁵ N HSQC-Spektrum des dunkel- (blau) und lichtadaptierten (rot) Blaulichtrezeptors. ^[45] 8	8
Abbildung 1.6: Arrheniusplots der Dunkelreversion der mit FMN rekonstituierten <i>E. coli</i> YcgF-(1-137) BLUF-Domäne. Die Halbwertszeiten wurden UV/VIS- (schwarz) und NMR-spektroskopisch (grau) bestimmt. ^[45] 8	8
Abbildung 1.7: Modell für das durch YcgF/ YcgE kontrollierte Proteinnetzwerk. ^[16] 9	9
Abbildung 1.8: UV-induzierte DNA-Schäden. 10	10
Abbildung 1.9: Durch UV-Strahlung induzierte CPD- und (6-4)-DNA-Photoschäden. Dargestellt sind die Schäden zwischen zwei benachbarten Thyminen. ^[8] 11	11
Abbildung 1.10: Bildung des (6-4)-Photoproduktes. 12	12
Abbildung 1.11: Verschiedene in Photolyasen vorkommende Antennenkofaktoren. A) FMN, B) FAD, C) MTHF, D) 8-HDF..... 13	13
Abbildung 1.12: Kristallstrukturen der A) <i>A. thaliana</i> (6-4)-DNA-Photolyase (PDB ID: 3FY4) und der B) <i>T. thermophilus</i> Klasse I CPD-DNA-Photolyase (PDB ID: 2JO9). ^[84, 85] 13	13
Abbildung 1.13: Anordnung der FADH [•] -W382-W359-W306 Kette in der <i>E. coli</i> DNA-Photolyase (PDB ID: 1DNP15) und Schema der Elektron- und Protontransferreaktionen. ^[93] 14	14
Abbildung 1.14: Schematische Darstellung der Photolyase-DNA-Wechselwirkungen. A) <i>D. melanogaster</i> (6-4)-Photolyase und B) <i>A. nidulans</i> CPD-Photolyase. ^[103, 104] 16	16
Abbildung 1.15: Möglicher Reparaturmechanismus der CPD-DNA-Photolyasen, in dem das CPD-Radikalanion durch den Glutamatrest 283 stabilisiert oder protoniert werden kann. ^[73] . 17	17
Abbildung 1.16: Möglicher Reparaturmechanismus der (6-4)-DNA-Photolyasen. ^[86, 104] 18	18

Abbildung 1.17: <i>A. thaliana</i> DASH Cryptochrom 3 mit repariertem CPD-Schaden. A) Ribbon Modell des gesamten Komplexes und B) Ansicht der CPD-Bindungstasche (PDB ID: 2VTB). ^[117]	22
Abbildung 2.1: Vektorkarte von pET28a.	28
Abbildung 2.2: Vektorkarte von pET36b.	29
Abbildung 4.1: Domänenaufbau von <i>E. coli</i> YcgF. Die Sekundärstrukturelemente der Linkerregion wurden mit dem Jpred Server (http://www.compbio.dundee.ac.uk/~www-jpred/) vorhergesagt. Die α -Helices sind in Form von roten Zylindern und β -Faltblätter mit blauen Pfeilen dargestellt.	66
Abbildung 4.2: Multiples Sequenzalignment von BLUF-Domänen enthaltenden Photorezeptoren. Das Sequenzalignment wurde mit ClustalW (http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/) generiert. Die gezeigten Sekundärstrukturelemente entsprechen der Struktur von <i>R. sphaeroides</i> BlrB (PDB ID: 2BYC; Kette B), das zur selben Unterfamilie wie das <i>E. coli</i> Genprodukt YcgF gehört. ^[3] Die Sekundärstrukturelemente sind analog zu Abb. 4.1 dargestellt. Der schwarze Pfeil kennzeichnet den C-terminalen Aminosäurerest der analysierten YcgF BLUF-Domäne. In pink hervorgehoben sind die der YcgF J α -Helix entsprechenden α -Helices aller BLUF-Domänen Strukturen. In allen Sequenzen konservierte Aminosäurereste sind hellblau unterlegt und die Positionen der konservierten Isoleucin- und Tryptophanreste, die in der YcgF BLUF-Domäne fehlen und durch ein Met 23 bzw. Ala 90 ersetzt wurden, sind gelb hervorgehoben. <i>E. coli</i> YcgF (P75990); <i>R. sphaeroides</i> BlrB (Q3IYE4); <i>R. sphaeroides</i> AppA, ein auf 1–125 Aminosäuren verkürztes C-terminales Fragment, (Q53119); SyPixD aus <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 (P74295); TePixD aus <i>T. elongatus</i> BP-1 (Q8DMN3), BlrP1 aus <i>K. pneumoniae</i> (B5XQZ5).	67
Abbildung 4.3: Bändermodell der <i>E. coli</i> YcgF-(1-137) BLUF-Domäne. Das 3D-Modell wurde anhand der <i>R. sphaeroides</i> BlrB Kristallstruktur (PDB ID: 2bycB) mit dem Server SWISS-MODEL (http://swissmodel.expasy.org/) im <i>First Approach Mode</i> generiert. ^[158] Dargestellt sind die ausgetauschten nativen Aminosäurereste (rot) und der FMN-Chromophor (gelb) des <i>E. coli</i> YcgF-(1-137).	68
Abbildung 4.4: Elutionsprofile der Größenausschlusschromatographie zweier mit FMN rekonstituierter <i>E. coli</i> YcgF-(1-137) BLUF-Domänen. Für die Chromatographie wurde eine Superdex 200 XK 16/ 70 Säule verwendet. Die Elution wurde bei 280 nm (schwarz) und 445 nm (rot) detektiert. A) Der aufgetragene YcgF-(1-137) Wildtyp wurde bei einem R_f von 0.75 CV und einem $OD_{445/280}$ Quotienten von 0.31 und B) die YcgF-(1-137)_A90W Mutante mit einem R_f von 0.8 CV und einem $OD_{445/280}$ Quotienten von 0.33 von der Säule eluiert. Der Doppelpeak im Bereich von 100 bis 120 mL im Elutionsprofil des Wildtyps zeigt die Elution des überschüssigen FMN Chromophors. Schwarze Pfeile kennzeichnen die Elution der jeweiligen BLUF-Domäne. Eingebettet sind die 15 % SDS-PAGE Gele beider zurückgefalteten und aufgereinigten YcgF BLUF-Domänen zu sehen.	71
Abbildung 4.6: CD-Spektren der verschiedenen lichtadaptierten <i>E. coli</i> YcgF-(1-137) BLUF-Domänen. YcgF-(1-137) (schwarz), YcgF-(1-137)_Y7F (blau), YcgF-(1-137)_M23I (rot), YcgF-(1-137)_M23L (grün), YcgF-(1-137)_A90W (hellblau) und YcgF-(1-137)_M23I_A90W (pink). Die mit FMN rekonstituierten BLUF-Domänen	

- waren in 2 mM Tris/HCl, 20 mM NaCl, pH 8.0 gelöst, die Spektren wurden bei 20 °C aufgenommen und je drei Spektren akkumuliert. 73
- Abbildung 4.8: Schmelzkurven der verschiedenen *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domänen. YcgF-(1-137) (schwarz), YcgF-(1-137)_Y7F (blau), YcgF-(1-137)_M23I (rot), YcgF-(1-137)_M23L (grün), YcgF-(1-137)_A90W (hellblau) und YcgF-(1-137)_M23I_A90W (pink). Die mit FMN rekonstituierten BLUF-Domänen befanden sich in 2 mM Tris/HCl, 20 mM NaCl, pH 8.0 und die Schmelzkurven wurden bei 207 nm von 20 °C bis 95 °C mit 2 °C/ min aufgenommen. 74
- Abbildung 4.9: Nah UV und VIS CD-Spektren der verschiedenen lichtadaptierten *E. coli* YcgF (1-137) BLUF-Domänen. YcgF-(1-137) (schwarz), YcgF-(1-137)_Y7F (blau), YcgF (1-137)_M23I (rot), YcgF-(1-137)_M23L (grün), YcgF-(1-137)_A90W (hellblau) und YcgF-(1-137)_M23I_A90W (pink). Die mit FMN rekonstituierten BLUF-Domänen waren in 20 mM Tris/HCl, 200 mM NaCl, pH 8.0 gelöst, die Spektren wurden bei 20 °C aufgenommen und je zehn Spektren akkumuliert. 75
- Abbildung 4.10: UV/VIS Absorptionsspektren der dunkel- (—) und lichtadaptierten (···) YcgF-(1-137) BLUF-Domänen. A) YcgF-(1-137) (16 µM), B) YcgF-(1-137)_Y7F (95 µM), C) YcgF-(1-137)_M23I (30 µM), D) YcgF-(1-137)_M23L (30 µM), E) YcgF-(1-137)_A90W (36 µM), F) YcgF-(1-137)_M23I_A90W (30 µM). Die lichtadaptierten YcgF-(1-137) BLUF-Domänen wurden unter einminütiger Bestrahlung in max. 5 cm Abstand mit der Weißlicht-LED-Lampe Liberty (*Conrad*) hergestellt. Die mit FMN rekonstituierten BLUF-Domänen waren in 20 mM Tris/HCl, 200 mM NaCl, pH 8.0 gelöst und die Spektren wurden bei 15 °C aufgenommen. 78
- Abbildung 4.11: Differenzspektren der verschiedenen *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domänen. YcgF-(1-137) (schwarz), YcgF-(1-137)_Y7F (blau), YcgF-(1-137)_M23I (rot), YcgF-(1-137)_M23L (grün), YcgF-(1-137)_A90W (hellblau) und YcgF-(1-137)_M23I_A90W (pink). 80
- Abbildung 4.12: Arrheniusplots mit Fehlerbalken der Dunkelreversion der verschiedenen mit FMN rekonstituierten *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domänen. YcgF-(1-137) (schwarz), YcgF-(1-137)_Y7F (blau), YcgF-(1-137)_M23I (rot), YcgF-(1-137)_M23L (grün), YcgF-(1-137)_A90W (hellblau) und YcgF-(1-137)_M23I_A90W (pink). Die UV/VIS Kinetiken wurden bei 503 nm in 20 mM Tris/HCl, 200 mM NaCl, pH 8.0 aufgenommen. Jede Halbwertszeit wurde mindestens dreimal gemessen und gemittelt. 81
- Abbildung 4.13: Tr-EPR Spektren der verschiedenen mit FMN rekonstituierten *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domänen. A) YcgF-(1-137), B) YcgF-(1-137)_Y7F, C) YcgF (1 137)_M23I, D) YcgF-(1-137)_M23L, E) YcgF-(1-137)_A90W, F) YcgF (1 137)_M23I_A90W. Die tr-EPR Spektren wurden 1 µs nach Anregung durch einen gepulsten Laser aufgenommen. Der Halbfeldübergang wurde nur bei einigen Mutanten zur Überprüfung des vorhandenen Triplettzustandes aufgenommen. 83
- Abbildung 4.14: Bänderdarstellung der *A. thaliana* (6-4)-DNA Photolyase (PDB ID: 3fy4B). Dargestellt sind die ausgetauschten nativen Aminosäurereste (rot) und der katalytische FAD-Kofaktor (gelb) des (6-4)-Enzyms. 87
- Abbildung 4.15: Elutionsprofile der Größenausschlusschromatographie zweier *A. thaliana* (6-4)-DNA-Photolyasen. Für die Chromatographie wurde eine Superdex 200 10/300 Säule verwendet. Die Elution wurde bei 280 nm (schwarz) und 450 nm (rot) detektiert.

A) Der aufgetragene *A. thaliana* (6-4)-Photolyase Wildtyp wurde bei einem R_f von 0.60 CV und einem OD_{445}/OD_{280} Quotienten von 0.076 und B) die W408Y Mutante mit einem R_f von 0.61 CV und einem OD_{445}/OD_{280} Quotienten von 0.082 von der Säule eluiert. Eingebettet sind die 12 % SDS-PAGE Gele beider aufgereinigter *A. thaliana* (6-4)-Photolyasen zu sehen. 89

Abbildung 4.16: CD Spektren der verschiedenen *A. thaliana* (6-4)-DNA-Photolyasen. (A) Native *A. thaliana* (6-4)-DNA-Photolyase und B) Überlagerung dieser mit den CD Spektren ihrer verschiedenen Mutanten. WT (schwarz), K246R (rot), H364N_L365R (blau), H368M (grün), H368Q (pink), H364N_L365R_H368M (türkis), H364N_L365R_H368Q (orange), W408Y (weinrot) und F427Q (grau). Die native *A. thaliana* (6-4)-Photolyase war in 2 mM Tris/HCl, 20 mM NaCl, 1 % Glycerin, pH 7.4 und ihre Mutanten waren in 5 mM Na_2HPO_4 , 200 mM NaCl, 1 % Glycerin, pH 7.4 gelöst. Die Spektren wurden bei 20 °C aufgenommen und je drei Spektren akkumuliert..... 91

Abbildung 4.17: Schmelzkurven der A) nativen und B) H364N_L365R *A. thaliana* (6-4)-DNA-Photolyasen. Die native *A. thaliana* (6-4)-Photolyase war in 2 mM Tris/HCl, 20 mM NaCl, 1 % Glycerin, pH 7.4 und ihre Mutante in 5 mM Na_2HPO_4 , 200 mM NaCl, 1 % Glycerin, pH 7.4 gelöst. Die Schmelzkurven wurden bei 207 nm von 20 °C bis 95 °C mit 2 °C/ min aufgenommen..... 91

Abbildung 4.18: Schmelzkurven der verschiedenen *A. thaliana* (6-4)-DNA-Photolyasen. WT (schwarz), K246R (rot), H364N_L365R (blau), H368M (grün), H368Q (pink), H364N_L365R_H368M (türkis), H364N_L365R_H368Q (orange), W408Y (weinrot) und F427Q (grau). Die native *A. thaliana* (6-4)-Photolyase war in 2 mM Tris/HCl, 20 mM NaCl, 1 % Glycerin, pH 7.4 und ihre Mutanten waren in 5 mM Na_2HPO_4 , 200 mM NaCl, 1 % Glycerin, pH 7.4 gelöst. Die Schmelzkurven wurden bei 207 nm von 20 °C bis 95 °C mit 2 °C/ min aufgenommen. 92

Abbildung 4.19: UV/VIS Absorptionsspektren verschiedener *A. thaliana* (6-4)-Photolyasen. A) Native Photolyase, B) H364N_L365R, C) H364N_L365R_H368Q, D) F427Q Mutanten. Die Photolyasen (45 – 60 μ M) waren in 50 mM Na_2HPO_4 , 500 mM NaCl, pH 7.4 gelöst und die Spektren wurden bei 15 °C aufgenommen. 94

Abbildung 4.20: Differenzspektren verschiedener *A. thaliana* (6-4)-DNA-Photolyasen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Zugabe von 10 mM Natriumdithionit. A) Native Photolyase, B) H364N_L365R, C) H364N_L365R_H368Q, D) F427Q Mutanten. Die spektroskopischen Bedingungen sind analog zu Abb. 4.19..... 95

Abbildung 4.21: A) Bindung der oxidierten *A. thaliana* (6-4)-Photolyase an ein doppelsträngiges ungeschädigtes 50-mer Oligonukleotid und B) Direkt-lineare Auftragung dieser DNA-Bindung. Doppelsträngiges, ungeschädigtes (a, Schwarz), doppelsträngiges, CPD-haltiges (b, grau) und einzelsträngiges, ungeschädigtes (c, blau) Oligonukleotid. Das Oligonukleotid (2 nM) wurde mit ansteigenden Konzentrationen der (6-4)-Photolyase gemischt und nach 30 minütiger Inkubation auf ein 6 % Polyacrylamidgel aufgetragen. Der E-S Komplex wurde mit der Gelshift-Methode von der ungebundenen DNA getrennt. Die bei doppelsträngigen Experimenten zu beobachtende ungeschiftete Doppelbande entsteht aufgrund einer unvollständigen Hybridisierung beider verwendeter Oligonukleotide. 97

- Abbildung 4.22: A) Bindungsgele von verschiedenen DNA-Photolyasen an ein T<>T Dimer haltiges (+) bzw. an ein ungeschädigtes (-) doppelsträngiges 50-mer Oligonukleotid. Die 6 % Polyacrylamidgele zeigen die 1) *A. nidulans* CPD-Photolyase, 2) native *A. thaliana* (6-4)-Photolyase und die 3) K246R 4) H364N_L365R, 5) H368M, 6) H368Q, 7) H364N_L365R_H368M, 8) H364N_L365R_H368Q, 9) W408Y bzw. 10) F427Q Mutante der *A. thaliana* (6-4)-Photolyase. Die Proben 11) und 12) enthalten als Referenz anstelle der Photolyase den jeweils verwendeten Puffer (Abschnitt 3.3.10). Der Pfeil kennzeichnet die Position der erwarteten geshifteten DNA-Bande B) Quantitative Bindungsdaten dieses Gelshiftexperiments. 99
- Abbildung 4.23: Reparaturassays von verschiedenen reduzierten *A. thaliana* (6-4)-DNA-Photolyasen unter Verwendung eines T<>T Dimer haltigen 50-mer Oligonukleotids. Die 6 % Harnstoffgele zeigen die A) native Photolyase und die B) K246R, C) H364N_L365R und D) H368M Mutanten. Proben wurden vor der Belichtung bei 365 nm, nach 10, 30 und 60 min entnommen, halbiert und jeweils ein Ansatz mit *VspI* verdaut. Am linken bzw. rechten Rand des jeweiligen Gels befindet sich ein Marker bestehend aus einem 40-mer und 15-mer IRD700 markiertem Oligonukleotid. 101
- Abbildung 4.24: Reparaturassays von verschiedenen reduzierten *A. thaliana* (6-4)-DNA-Photolyasen unter Verwendung eines ein T<>T Dimer und eine Loopstruktur bestehend aus vier Basen enthaltenden 50-mer Oligonukleotids. Die 6 % Harnstoffgele zeigen die A) native Photolyase und die B) H368Q, C) H364N_L365R_H368Q und D) W408Y Mutanten. Proben wurden analog zu Abb. 4.24 behandelt. Am linken bzw. rechten Rand des jeweiligen Gels befindet sich ein Marker bestehend aus einem 40-mer und 15-mer IRD700 markiertem Oligonukleotid. 102
- Abbildung 4.25: Während der Kristallisation der *A. thaliana* (6-4)-DNA-Photolyase erhaltene Kristalle. Links: 0.0058 M NiCl₂, 0.085 M Tris/HCl, pH 8.5, 0.85 M LiSO₄, 15 % Glycerin, Rechts: 0.0058 M NiCl₂, 0.085 M Tris/HCl, pH 8.0, 1.15 M LiSO₄, 15 % Glycerin. Die Kristalle wurden bei 4 °C nach 1 bis 2 Wochen erhalten. 103
- Abbildung 4.26: Domänenaufbau zweier (6-4)-DNA-Photolyasen. Die Domänen wurden vom Pfam/Sanger Server (<http://pfam.sanger.ac.uk/protein?acc=Q52Z99>) und die C-terminale α_{22} -Helix von der *A. thaliana* (6-4)-DNA-Photolyasestruktur übernommen (PDB ID: 3FY4). Ds6-4PHR: *D. salina* (6-4)-DNA-Photolyase (Q52Z99), At6-4PHR : *A. thaliana* (6-4)-DNA-Photolyase (O48652). 105
- Abbildung 4.27: Elutionsprofil der Größenausschlusschromatographie der *D. salina* (6-4)-DNA-Photolyase. Für die Chromatographie wurde eine Superdex 200 10/300 Säule verwendet. Die Elution wurde bei 280 nm (schwarz) und 450 nm (rot) detektiert. Die aufgetragene *D. salina* (6-4)-DNA-Photolyase wurde bei einem R_f von 0.6 CV und einem OD₄₅₀/OD₂₈₀ Quotienten von 0.067 von der Säule eluiert. Der Pfeil zeigt auf den Peak, der die Elution der aufgereinigten *D. salina* (6-4)-DNA-Photolyase repräsentiert. Eingebettet ist das 12 % SDS-PAGE Gel der aufgereinigten *D. salina* (6-4)-DNA-Photolyase zu sehen. 107
- Abbildung 4.29: Aufgereinigte DNA-Photolyasen. Links: *D. salina* (6-4)-Photolyase, mitte: *T. thermophilus* CPD-Photolyase, rechts: *A. thaliana* (6-4)-Photolyase. 108
- Abbildung 4.30: UV/VIS Absorptionsspektren der verschiedenen Redoxzustände der *D. salina* (6-4)-DNA-Photolyase. Vollständig oxidierte Form (schwarz), nach Aufreinigung erhaltene

Mischform aus oxidiertem und neutralem semichinoidem Zustand (grün), neutrale semichinoide Form (türkis) und vollständig reduzierte Form (rot). Die Herstellung der reinen FAD-Redoxzustände des <i>D. salina</i> Enzym wird nachfolgend beschrieben. Die <i>D. salina</i> (6-4)-Photolyase (29.4 μM) war in 50 mM Na_2HPO_4 , 2 M NaCl, 10 % Glycerin, pH 7.4 gelöst und die Spektren wurden bei 15 °C aufgenommen.	109
Abbildung 4.31: Differenzspektren der <i>D. salina</i> (6-4)-DNA-Photolyase zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung mit Blaulicht ($\lambda_{\text{max}} = 450 \text{ nm}$, 1.45 mW/cm^2). Die <i>D. salina</i> (6-4)-Photolyase war in 50 mM Na_2HPO_4 , 2 M NaCl, 10 % Glycerin, pH 7.4 gelöst und die Spektren wurden bei 15 °C aufgenommen.	110
Abbildung 4.32: Differenzspektren der <i>D. salina</i> (6-4)-DNA-Photolyase zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung mit Blau- bzw. Weißlicht (Diaprojektor Leitz Prado Universal (<i>Leitz</i>)). Die spektroskopischen Bedingungen sind analog zu Abb. 4.31.	111
Abbildung 4.33: Differenzspektren der <i>D. salina</i> (6-4)-DNA-Photolyase zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung mit Blau- bzw. Weißlicht und nach Dunkeladaptation. Die spektroskopischen Bedingungen sind analog zu Abb. 4.31.	112
Abbildung 4.34: Differenzspektren der <i>D. salina</i> (6-4)-DNA-Photolyase nach Zugabe von 10 mM DTT bzw. 5 min Dunkeladaptation. Die spektroskopischen Bedingungen sind analog zu Abb. 4.35, und das Spektrum entsprechend skaliert, um die geringe durch DTT-Zugabe bedingte Veränderung des Differenzspektrums der <i>D. salina</i> (6-4)-DNA-Photolyase aufzuzeigen.	112
Abbildung 4.35: A) Differenzspektren der <i>D. salina</i> (6-4)-DNA-Photolyase zu verschiedenen Zeitpunkten nach Zugabe von 10 mM DTT und Bestrahlung mit Blaulicht ($\lambda_{\text{max}} = 450 \text{ nm}$, 1.45 mW/cm^2). B) Zeitabhängige Darstellung der Absorptionsänderung bei der 636 nm, den neutralen semichinoiden FAD-Zustand repräsentierend. Die <i>D. salina</i> (6-4)-Photolyase war in 50 mM Na_2HPO_4 , 2 M NaCl, 10 % Glycerin, pH 7.4 gelöst und die Spektren wurden bei 15 °C aufgenommen.	113
Abbildung 4.36: Differenzspektren der <i>D. salina</i> (6-4)-DNA-Photolyase zu verschiedenen Zeitpunkten nach Zugabe von 10 mM DTT und Bestrahlung mit Blau- bzw. Weißlicht (Diaprojektor Leitz Prado Universal (<i>Leitz</i>)). Die spektroskopischen Bedingungen sind analog zu Abb. 4.35.	114
Abbildung 4.37: Differenzspektren der <i>D. salina</i> (6-4)-DNA-Photolyase zu verschiedenen Zeitpunkten nach Zugabe von 10 mM DTT, Bestrahlung mit Blau- bzw. Weißlicht und nach Dunkeladaptation. Die spektroskopischen Bedingungen sind analog zu Abb. 4.35.	114
Abbildung 4.38: Absorptionsspektren der <i>D. salina</i> (6-4)-DNA-Photolyase zu verschiedenen Zeitpunkten nach Zugabe von $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ausgehend vom neutralen semichinoiden Zustand, und der aufgereinigten Photolyase (pink). Ebenfalls dargestellt ist das Absorptionsspektrum des $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (---). Die <i>D. salina</i> (6-4)-Photolyase war in 50 mM Na_2HPO_4 , 2 M NaCl, pH 7.4 gelöst und die Spektren wurden bei 15 °C aufgenommen.	115
Abbildung 4.39: A) CD-Spektren der <i>D. salina</i> (6-4)-DNA-Photolyase in verschiedenen Redoxzuständen und B) Vergleich der neutralen semichinoiden <i>D. salina</i> mit der <i>A. thaliana</i> (6-4)-DNA-Photolyase. Vollständig oxidierte Form (schwarz), neutrale semichinoide Form (türkis) und vollständig reduzierte Form (rot) der <i>D. salina</i> (6-4)-Photolyase. Die <i>D. salina</i> (6-4)-Photolyase war in 5 mM Na_2HPO_4 , 200 mM NaCl, 1 %	170

Glycerin, pH 7.4 gelöst, die Spektren wurden bei 5 °C aufgenommen und dreimal akkumuliert. Die *A. thaliana* (6-4)-Photolyase (...) war in 2 mM Tris/HCl, 20 mM NaCl, 1 % Glycerin, pH 7.4 gelöst, die Spektren wurden bei 20 °C aufgenommen und je drei Spektren akkumuliert..... 116

Abbildung 4.40: Schmelzkurven der A) oxidierten B) drei Redoxzustände der *D. salina* (6-4)-DNA-Photolyase. Vollständig oxidierte Form (schwarz), neutrale semichinoide Form (türkis) und vollständig reduzierte Form (rot) der *D. salina* (6-4)-Photolyase. Die *D. salina* (6-4)-Photolyase war in 5 mM Na₂HPO₄, 200 mM NaCl, 1 % Glycerin, pH 7.4 gelöst und die Schmelzkurven wurden von 5 °C bis 95 °C mit 2 °C/ min aufgenommen..... 117

Abbildung 4.41: Nah UV und VIS CD-Spektren der *D. salina* (6-4)-DNA-Photolyase in unterschiedlichen Redoxzuständen. Vollständig oxidierte Form (schwarz), neutrale semichinoide Form (türkis) und vollständig reduzierte Form (rot). Die *D. salina* (6-4)-Photolyase war in 50 mM Na₂HPO₄, 2 M NaCl, 10 % Glycerin, pH 7.4 gelöst und die Spektren wurden bei 5 °C aufgenommen, zehn Spektren akkumuliert und über neun Punkte nachträglich geglättet..... 118

Abbildung 4.42: A) Bindung der *D. salina* (6-4)-DNA-Photolyase in unterschiedlichen Redoxzuständen an ein doppelsträngiges ungeschädigtes 50-mer Oligonukleotid und B) Direkt-lineare Auftragung der DNA-Bindung. Oxidierte (a, Schwarz), neutrale semichinoide (b, türkis) und vollständig reduzierte (c, rot) *D. salina* (6-4)-Photolyase. Das Oligonukleotid (2 nM) wurde mit ansteigenden Konzentrationen der (6-4)-Photolyase gemischt und nach 30 minütiger Inkubation auf ein 6 % Polyacrylamidgel aufgetragen. Der E-S Komplex wurde mit der Gelshift-Methode von der ungebundenen DNA getrennt. 119

Abbildung 4.43: A) Bindung der *D. salina* (6-4)-DNA-Photolyase in unterschiedlichen Redoxzuständen an ein einzelsträngiges ungeschädigtes 50-mer Oligonukleotid und B) Direkt-lineare Auftragung der DNA-Bindung. Oxidierte (a, Schwarz), neutrale semichinoide (b, türkis) und vollständig reduzierte (c, rot) *D. salina* (6-4)-Photolyase. Das Oligonukleotid (2 nM) wurde mit ansteigenden Konzentrationen der (6-4)-Photolyase gemischt und nach 30 minütiger Inkubation auf ein 6 % Polyacrylamidgel aufgetragen. Der E-S Komplex wurde mit der Gelshift-Methode von der ungebundenen DNA getrennt. 120

Abbildung 5.1: Bändermodell der *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domäne. Das 3D-Modell wurde anhand der *R. sphaeroides* BlrB Kristallstruktur (PDB ID: 2bycB) mit dem Server SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) im *First Approach Mode* generiert.^[158] Dargestellt sind die ausgetauschten nativen Aminosäurereste (rot), weitere am Photozyklus und der Signalweiterleitung beteiligte Aminosäuren (pink), sowie der FMN-Chromophor (gelb) des *E. coli* YcgF-(1-137). 123

Abbildung 5.2: Zusammenfassung der beobachteten Charakteristika der verschiedenen *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domänenmutanten und Beschreibung der möglichen Funktionen der nativen bzw. der eingefügten Aminosäurereste. In den Modellen der YcgF-(1-137) BLUF-Domäne sind die jeweils eingefügten Mutationen in grün und die jeweils unveränderten Aminosäurereste in rot dargestellt. 125

- Abbildung 5.3: Vergleich verschiedener EPR-Spektren. A) *E. coli* YcgF-(1-137), B) *E. coli* YcgF-(1-137)_M23I, C) *R. sphaeroides* AppA, D) *A. sativa* LOV2, E) *Synechocystis* sp. SyPixD und F) FMN-Lösung.^[154, 155, 176] 128
- Abbildung 5.4: A) EPR-Spektren und B) nah-UV CD-Spektren verschiedener *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domänen. YcgF-(1-137) (schwarz), YcgF-(1-137)_M23I (rot), YcgF-(1-137)_A90W (hellblau) und YcgF-(1-137)_M23I_A90W (pink). Das von der dunkeladaptierten YcgF-(1-137)_M23I_A90W aufgenommene tr-EPR-Spektrum repräsentiert die W_{in} - C) und das CD-Spektrum des lichtadaptierten Zustands die W_{out} - Konformation D) des eingefügten Tryptophan 90. 129
- Abbildung 5.5: A) Arrheniusplots der Dunkelreversion und B) schematisches Energiediagramm zur Verdeutlichung der unterschiedlichen Aktivierungsenergien der verschiedenen mit FMN rekonstituierten *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domänen. YcgF-(1-137) (schwarz), YcgF-(1-137)_Y7F (blau), YcgF-(1-137)_M23I (rot), YcgF-(1-137)_M23L (grün), YcgF-(1-137)_A90W (hellblau) und YcgF-(1-137)_M23I_A90W (pink). 131
- Abbildung 5.6: Zusammenfassung der wesentlichen Abläufe der vier potentiellen Mechanismen des BLUF-Domänen Photozyklus. 132
- Abbildung 5.7: Möglicher Photozyklus der *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domäne. A) Grundzustand der YcgF-(1-137) BLUF-Domäne, B) $FAD^{\bullet-}$ -Tyr7 $^{\bullet-}$ -Radikalpaar, C) 180 ° Drehung des Glutamin 49, D) Signalzustand und E) durch *Intersystem Crossing* generierter Tripletzustand des FAD. 133
- Abbildung 5.8: Blaulichtinduzierte strukturelle Änderungen der C-terminalen J α -Helix in der *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domäne. 135
- Abbildung 5.9: Signalübertragungswege in der *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domäne. A) Nativer BLUF-Photorezeptor, B) M23I_A90W Doppelmutante. Das dargestellte 3D-Modell wurde anhand der *R. sphaeroides* BlrB Kristallstruktur (PDB ID: 2bycB) mit dem Server SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) im *First Approach Mode* generiert.^[158] Die an der Signalweiterleitung beteiligten Aminosäuren und Sekundärstrukturelemente sind in rot dargestellt. Ebenfalls gezeigt sind die Impulsweiterleitung ausgehend vom Glutamin 49 (schwarze Pfeile), die Signalübertragung ausgehend von einer eventuellen Umlagerung des Methionin 23 (blaue Pfeile) und in der Doppelmutante ein möglicher weiterer Weg beginnend mit dem lichtinduzierten Wechsel des Tryptophan 90 von der W_{in} - in die W_{out} -Konformation (grüner Pfeil). 136
- Abbildung 5.10: A) Signalübertragungsweg in BlrP1 aus *K. pneumoniae* und B) aktives Zentrum der EAL-Domäne von BlrP1. Dargestellt ist die Signalübertragung ausgehend vom Flavin (gelb), weitergeleitet über die BLUF-Domäne (blau) bis zur EAL-Domäne (grau) durch schwarze Pfeile. Hervorgehoben sind die C-terminale α 4-Helix (rot), der β 4- β 5-Loop und der β 5-Strang (gelb), die α 5-Verbindungshelix (grün), der Loop (grün) zwischen der α 6-Dimerisierungshelix (hellblau) und dem β 7-Strang (grün). Im aktiven Zentrum der EAL-Domäne ist die essentielle Koordination des Manganions 2 (lila) und des Wassermoleküls (blau) durch den Glutamatrest 359 (grün) gezeigt.^[14] 137
- Abbildung 5.11: Schematische Darstellung der gekoppelten photo- und temperatursensorischen Eigenschaften der *E. coli* YcgF BLUF-Domäne und ihre Interaktion mit YcgE. Unter Lichteinstrahlung bildet die YcgF BLUF-Domäne ihren Signalzustand aus, der konformationelle Änderungen in der C-terminalen EAL-Domäne induziert. Daraufhin ist

diese in der Lage, an die MerR-like Domäne des YcgE zu binden, so dass YcgE von der Operatorbindungsstelle abdissoziiert. Dieser Vorgang setzt eine Reihe von Mechanismen in Gang, in Folge derer die *E. coli* Bakterien aus ihren Biofilm abwandern können. Niedrige Temperaturen verzögern hierbei die Rückkonversion des Signalzustands der YcgF BLUF-Domäne. Auf diese Weise wird die Mobilität der Bakterien garantiert. ... 139

- Abbildung 5.12: Schema eines möglichen Ablaufs für die Verwendung der *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domäne zur Untersuchung blaulichtinduzierter durch verschiedene Effektor-domänen ausgeübte Antworten. Hierfür wird zunächst die YcgF-BLUF-Domäne (A) mit verschiedenen Effektor-domänen verknüpft (B). In einem nächsten Schritt können die verschiedenen lichtinduzierten Reaktionen der Effektor-domänen, z.B. in Abhängigkeit von der Übertragungsdauer des eingehenden Signals analysiert werden (C). Nach ausreichender Charakterisierung der entsprechenden Photoantwort kann das jeweilige System als Kontrolle für die Etablierung bzw. Durchführung von Assays verwendet werden (D). 140
- Abbildung 5.13: Radiales Kladogramm der phylogenetischen Verwandtschafts-beziehungen der Photolyase/ Cryptochrom Familie.^[191] 141
- Abbildung 5.14: FAD-Bindungstasche der *A. thaliana* (6-4)-DNA-Photolyase (PDB ID: 3FY4). Dargestellt sind die Wasserstoffbrücken zwischen dem Glutamin- 298 und Lysinrest 244 und zwischen Lysin 244 und dem FAD. 142
- Abbildung 5.15: Oberflächendarstellung der *A. thaliana* (6-4)-DNA-Photolyase (PDB ID: 3FY4). In der Struktur ist der katalytische FAD-Kofaktor (rot) vom Lösungsmittel direkt zugänglich..... 144
- Abbildung 5.16: Phosphatbindungsstelle der *A. thaliana* (6-4)-Photolyase (PDB ID: 3FY4). A) Superposition des *A. thaliana* (6-4)-Enzyms (rosa) mit dem *D. melanogaster* (6-4)-Photolyase/ (6-4)-DNA-Komplex (blau) (PDB ID: 3CVV). Dargestellt ist die Orientierung des Phosphations (rote Sphären) zum (6-4)-Schaden, den beiden mit der großen, sowie kleinen Furche interagierenden α -Helices und dem katalytischem FAD-Kofaktor (gelb). B) Oberflächendarstellung des elektrostatischen Potentials, welche die positiv geladene DNA-Bindungstasche zeigt und C) Präsentation der konservierten (6-4)/clock-Cluster mit der Position des Phosphatbindungsmotiv.^[85] 145
- Abbildung 5.17: Schematische Darstellung der Bindungsexperimente. A) Spezifische Bindung an den CPD-Schaden. In diesem Fall binden die Oberflächenmutanten der *A. thaliana* (6-4)-Photolyase überwiegend an das geschädigte Oligonukleotid. B) Bei der unspezifischen Bindung, können die Oberflächenmutanten statistisch entsprechend ihrer Dissoziationskonstanten sowohl an die einzelsträngige als auch an die doppelsträngige ungeschädigte DNA binden..... 146
- Abbildung 5.18: Schematische Darstellung über den Ablauf des Reparaturassays. A) Oberflächenmutante der *A. thaliana* (6-4)-Photolyase zu Beginn des Assays, B) nach einer 30 minütigen Inkubation kann das (6-4)-Enzym das geschädigte Oligonukleotid binden und C) nach Belichtung bei 356 nm kann die Photolyase den CPD-Schaden reparieren. 148
- Abbildung 5.19. Superposition des *D. melanogaster* (6-4)-Photolyase/ (6-4)-DNA-Komplex (blau/ orange) (PDB ID: 3CVV) und des *A. nidulans* CPD-Photolyase/ CPD-DNA-Komplex (grün/ rot) (PDB ID: 1TEZ). A) Darstellung des zur Stabilisierung des Photolyase/

- DNA Komplex in die deformierte geschädigte DNA eingelagerten Loops. Hierbei ist deutlich zu erkennen, dass der Loop des (6-4)-Enzyms weiter in die deformierte DNA hineinreicht und den Argininrest 421 (blaue Sphären) in die direkte Nähe zum P⁰-Phosphat bringt. B) Position und Abstand des Argininrestes 421 (blau) zum P⁰-Phosphat. 149
- Abbildung 5.20: DNA-Bindungstaschen A) *D. melanogaster* (6-4)-Photolyase (PDB ID: 3CVV) und B) *A. nidulans* CPD-Photolyase (PDB ID: 1TEZ). Dargestellt sind der jeweilige Photoschaden (grau), die für die Erkennung und Reparatur des jeweiligen Schadens selektierenden Aminosäuren (grün) und an der Bindung des DNA-Schadens beteiligte Reste (rot). 150
- Abbildung 5.21: Superposition der *D. melanogaster* (6-4)-Photolyase (blau/ orange) (PDB ID: 3CVV) und *A. nidulans* CPD-Photolyase (grün/ rot) (PDB ID: 1TEZ) im Komplex mit dem den jeweiligen DNA-Schaden enthaltenden Oligonukleotid. A) Darstellung der nach Bindung des jeweiligen DNA-Schadens beobachteten Biegungsgrade des DNA-Doppelstranges und B) der unterschiedlichen Ausrichtungen der gebundenen, geschädigten DNA..... 152
- Abbildung 5.22: Darstellung der beiden an die kleine (links) und große (rechts) Furche angelagerten α -Helices. Die Superposition der *D. melanogaster* (6-4)-Photolyase (blau/ orange) (PDB ID: 3CVV) und *A. nidulans* CPD-Photolyase (grün/ rot) (PDB ID: 1TEZ) im Komplex mit dem den jeweiligen DNA-Schaden enthaltenden Oligonukleotid zeigt lediglich geringe Unterschiede in der Positionierung beider Helices..... 153
- Abbildung 5.23: Elektronentransferweg der *D. salina* (6-4)-DNA-Photolyase. Das dargestellte 3D-Model wurde anhand der Kristallstruktur der *A. thaliana* (6-4)-DNA-Photolyase (PDB ID: 3fy4B) mit dem Server SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) im *First Approach Mode* generiert.^[158] Dargestellt sind die am Elektronentransfer beteiligten Tryptophanreste (rot), das FAD (gelb), der Elektronentransferweg (blaue Pfeile) und die Protonenabgabe ans Lösungsmittel (grüner Pfeil)..... 157
- Abbildung 5.24: CD-Spektren und lichtinduzierte strukturelle Veränderungen der *D. salina* (6-4)-DNA-Photolyase. A) Fern-UV und B) nah-UV CD-Spektrum. Vollständig oxidierte Form (schwarz), neutrale semichinoide Form (türkis) und vollständig reduzierte Form (rot). C) schematische Darstellung der lichtinduzierten Bewegung der α -helikalen Extension. Gezeigt sind die Photolyaseregion (schwarz), die C-terminale α -Helix (rot) und der FAD-Kofaktor (gelb)..... 160
- Abbildung 5.25: Schematische Darstellung der potentiellen lichtinduzierten Mechanismen der *D. salina* (6-4)-DNA-Photolyase. A) und B) Photolyasemechanismen. C) Cryptochrommechanismus. I. Oxidierte Photolyase, II. neutrale semichinoide Photolyase, III. vollständig reduzierte Photolyase. Gezeigt sind die Photolyaseregion (schwarz), die C-terminale α -Helix (rot), der FAD-Kofaktor (gelb) und ein bislang noch nicht identifizierter Interaktionspartner (blau)..... 162
- Abbildung 6.1: Multiple Sequenzalignment verschiedener (6-4)-DNA-Photolyasen. Das Sequenzalignment wurde mit ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/>) generiert. Die gezeigten Sekundärstrukturelemente entsprechen der Struktur der *A. thaliana* (6-4)-Photolyase (3F4Y). Die Sekundärstrukturelemente sind in Form von roten Zylindern (α -Helices) und blauen Pfeilen (β -Faltblätter) dargestellt. In hellgelb bzw. rosa

hervorgehoben sind die Photolyase- und die FAD-Bindungsdomäne und in allen Sequenzen konservierte Aminosäurereste sind hellblau unterlegt. Die grünen, gelben, pinken und orangen Balken markieren die Phosphatbindungsstelle, das PLK-Motiv, den Schwefel-Loop und die C-terminale α -Helix. At6-4PHR: *A. thaliana* (6-4)-Photolyase (O48652), Ds6-4PHR: *D. salina* (6-4)-Photolyase (Q52Z99), Dm6-4PHR: *D. melanogaster* (6-4)-Photolyase (Q24281), Xl6-4PHR: *X. laevis* (6-4)-Photolyase (Q9I910), Ot6-4PHR: *O. tauri* (6-4)-Photolyase (Q5IFN1)..... 181

Abbildung 6.2: UV/Vis Absorptionsspektren verschiedener *A. thaliana* (6-4)-DNA-Photolyasemutanten. A) K246R, B) H368M, C) H368Q, D) H364N_L365R_H368M, E) W408Y. Die Photolyasen waren in 50 mM Na₂HPO₄, 500 mM NaCl, pH 7.4 gelöst und die Spektren wurden bei 15 °C aufgenommen. 183

Abbildung 6.3: Absorptionsspektren der *A. thaliana* (6-4)-DNA-Photolyase zu verschiedenen Zeitpunkten nach Zugabe von 10 mM DTT und Bestrahlung mit Blaulicht. Während der Messung unter aeroben Bedingungen aggregierte die Photolyase, hier sichtbar an der starken Zunahme der Absorption im Bereich von 300 bis 350 nm. Die *A. thaliana* (6-4)-Photolyase war in 20 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 10 % Glycerin, pH 7.4 gelöst und die Spektren wurden bei 15 °C aufgenommen. 184

Abbildung 6.4: Differenzspektren verschiedener *A. thaliana* (6-4)-DNA-Photolyasen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Zugabe von 10 mM Natriumdithionit. A) K246R, B) H368M, C) H368Q, D) H364N_L365R_H368M, E) W408Y. Die Photolyasen (45 – 60 μ M) waren in 50 mM Na₂HPO₄, 500 mM NaCl, pH 7.4 gelöst und die Spektren wurden bei 15 °C aufgenommen. 185

Abbildung 6.5: Reparaturassays von verschiedenen reduzierten *A. thaliana* (6-4)-DNA-Photolyasen unter Verwendung eines T<>T Dimer haltigen 50-mer Oligonukleotids. Die 6 % Harnstoffgele zeigen die A) H368Q, B) H364N_L365R_H368M, C) H364N_L365R_H368M, D) W408Y und E) F427 *A. thaliana* (6-4)-DNA-Photolyasemutanten. Proben wurden vor der Belichtung bei 365 nm, nach 10, 30 und 60 min entnommen, halbiert und jeweils ein Ansatz mit *VspI* verdaut. Am linken bzw. rechten Rand des jeweiligen Gels befindet sich ein Marker bestehend aus einem 40-mer und 15-mer IRD700 markiertem Oligonukleotid. 187

6.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Zusammenfassung der photochemischen Eigenschaften der <i>E. coli</i> YcgF, <i>Synechocystis</i> sp. SyPixD, <i>T. elongatus</i> TePixD, <i>R. sphaeroides</i> BlrB und <i>R. sphaeroides</i> AppA BLUF-Domänen ^[19-23, 29, 30, 45, 47]	7
Tabelle 2.1: Verwendete Geräte.....	26
Tabelle 2.2: Verwendete Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien.....	28
Tabelle 2.3: Klonierungsprimer für <i>A. thaliana</i> (6-4)-DNA-Photolyase; die Schnittstellen sind unterstrichen und das Stoppcodon ist kursiv dargestellt.....	31
Tabelle 2.4: Mutageneseprimer für <i>A. thaliana</i> (6-4)-DNA-Photolyase: Die Primerbezeichnung enthält die jeweils veränderte Aminosäure. Ausgetauschte Basen sind rot und eventuell enthaltene Schnittstellen unterstrichen dargestellt.....	31
Tabelle 2.5: Mutageneseprimer für die <i>E. coli</i> BLUF Domäne YcgF-(1-137): Die Primerbezeichnung enthält die jeweils veränderte Aminosäure. Ausgetauschte Basen sind rot und eventuell enthaltene Schnittstellen unterstrichen dargestellt.....	32
Tabelle 2.6: Für Gelshift-Assay verwendete Oligonukleotide: Die Markierungen (*) befinden sich am 5'-Ende. In den Primern enthaltene <i>VspI</i> -Schnittstellen sind unterstrichen dargestellt. Alle Oligonukleotide wurden mit dem Programmen Mfold (<i>Rensselaer</i>) und DNAMelt (<i>COMB Bioinformatics</i>) auf Loopregionen und Hairpinstrukturen überprüft.	32
Tabelle 3.1: PCR Programm für Phusion Polymerase bei Verwendung des Robocycler Gradient 96	37
Tabelle 3.2: Mit Gene Amp PCR System 2400 durchgeführte Mutageneseprogramme für Phusion Polymerase / Pfu-Turbo Polymerase	39
Tabelle 4.1: Generierte YcgF-(1-137) BLUF-Domänenmutanten und erwartete Funktion bzw. Eigenschaften der jeweiligen ausgetauschten Aminosäure.	68
Tabelle 4.2: Maximale Rückfaltungsausbeuten der verschiedenen <i>E. coli</i> YcgF-(1-137) BLUF-Domänen.....	70
Tabelle 4.3: Aufgereinigte Proteinmenge pro Liter <i>E. coli</i> Kultur, OD _{445/280} Quotienten und Protein/Chromophor Verhältnisse der verschiedenen mit FMN rekonstituierten und aufgereinigten <i>E. coli</i> YcgF-(1-137) BLUF-Domänen.....	72
Tabelle 4.4: Absorptionsmaxima des dunkel- bzw. lichtadaptierten Zustandes und Rotverschiebung der verschiedenen mit FMN rekonstituierten <i>E. coli</i> YcgF-(1-137) BLUF-Domänen....	77
Tabelle 4.5: Isosbestische Punkte der mit FMN rekonstituierten YcgF-(1-137) BLUF-Domänen.....	79
Tabelle 4.6: Halbwertzeiten der verschiedenen mit FMN rekonstituierten <i>E. coli</i> YcgF-(1-137) BLUF-Domänen. Die BLUF-Domänen waren in 20 mM Tris/HCl, 200 mM NaCl, pH 8.0 gelöst und die Halbwertzeiten wurden bei 19 °C gemessen.	80
Tabelle 4.7: Aktivierungsenergien der verschiedenen mit FMN rekonstituierten <i>E. coli</i> YcgF-(1-137) BLUF-Domänen. Die BLUF-Domänen waren in 20 mM Tris/HCl, 200 mM NaCl gelöst.	82

Tabelle 4.8: Generierte Mutanten der <i>A. thaliana</i> (6-4)-DNA-Photolyase. At6-4PHR: <i>A. thaliana</i> (6-4)-Photolyase, AnPHR: <i>A. nidulans</i> CPD-Photolyase, AtCry3: <i>A. thaliana</i> DASH Cryptochrom 3.....	86
Tabelle 4.9: Aufgereinigte Proteinmenge pro Liter und OD _{450/280} Quotienten der verschiedenen <i>A. thaliana</i> (6-4)-DNA-Photolyasen.....	90
Tabelle 4.10: Absorptionsmaxima der verschiedenen <i>A. thaliana</i> (6-4)-DNA-Photolyasen.	93
Tabelle 4.11: Dissoziationskonstanten der Bindung der oxidierten <i>A. thaliana</i> (6-4)-Photolyase an verschiedene 50-mer Oligonukleotide.....	98
Tabelle 4.12: Absorptionsmaxima der verschiedenen Redoxzustände der <i>D. salina</i> (6-4)-DNA-Photolyase.....	109
Tabelle 4.13: Dissoziationskonstanten der unspezifischen Bindung der <i>D. salina</i> (6-4)-DNA-Photolyase in unterschiedlichen Redoxzuständen an doppelsträngige und einzelsträngige ungeschädigte 50-mer Oligonukleotide. Die zu den ermittelten Bindungskurven gehörenden DNA-Bindungskurven sind in Abb. 4.42B und 4.43B dargestellt.....	121
Tabelle 4.14: Dissoziationskonstanten der Bindung der vollständig reduzierten katalytisch aktiven <i>D. salina</i> (6-4)-DNA-Photolyase an ein doppelsträngiges bzw. einzelsträngiges CPD-haltiges 50-mer Oligonukleotid.....	121
Tabelle 5.1: Auflistung der Abstände der den jeweiligen DNA-Photoschaden umgebenden Phosphatreste der an die Photolyasen gebundenen Oligonukleotide.....	152
Tabelle 6.1: In den Differenzspektren der mit FMN rekonstituierten YcgF-(1-137) BLUF-Domänen auftretende Maxima und Minima	178
Tabelle 6.2: Absorptionsmaxima der verschiedenen <i>A. thaliana</i> (6-4)-DNA-Photolyasen	182
Tabelle 6.3: Mit dem Odyssey Infrared Imaging System (<i>LI-COR Biosciences</i>) aus 6 % Harnstoffgelen extrahierte Intensitäten der einzelnen Reparaturassays der verschiedenen <i>A. thaliana</i> (6-4)-DNA Photolyasen in Gegenwart von doppelsträngigem CPD-haltigem 50-mer Oligonukleotid.	186
Tabelle 6.4: Mit dem Odyssey Infrared Imaging System (<i>LI-COR Biosciences</i>) aus 6 % Harnstoffgelen extrahierte Intensitäten der einzelnen Reparaturassays der verschiedenen <i>A. thaliana</i> (6-4)-DNA Photolyasen in Gegenwart von doppelsträngigem, eine Loopstruktur bestehend aus vier Basen enthaltenden CPD-haltigem 50-mer Oligonukleotid.....	186
Tabelle 6.5: Kristallisationsansätze der <i>A. thaliana</i> (6-4)-DNA-Photolyasen. Die Kristallisationsansätze wurden als sitting drop im 96 well Format mit dem Cartesian Microsys TM SQ4000 (<i>Genomic Solutions</i>) auspipettiert.	188

6.3. Maxima und Minima der Licht- minus Dunkelabsorptionsspektren der *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domänen

BLUF Mutante	Maxima / nm	Minima / nm
YcgF-(1-137)_Y7F	-	-
YcgF-(1-137)_M23I	393, 438, 468, 502	337, 379, 428, 449, 481
YcgF-(1-137)_M23L	396, 436, 467, 503	343, 378, 424, 449, 481
YcgF-(1-137)_A90W	396, 437, 470, 504	341, 385, 427, 452, 482
YcgF-(1-137)_M23I_A90W	394, 436, 468, 502	339, 378, 426, 449, 480
YcgF-(1-137)_WT	395, 436, 469, 502	340, 378, 427, 451, 481

Tabelle 6.1: In den Differenzspektren der mit FMN rekonstituierten YcgF-(1-137) BLUF-Domänen auftretende Maxima und Minima

6.4. Temperaturabhängige Halbwertzeiten der *E. coli* YcgF-(1-137) BLUF-Domänen

6.4.1. YcgF-(1-137)

Temperatur	Halbwertzeit
24 °C	8 min 6 s \pm 6 s
19 °C	14 min 42 s \pm 4 min 48 s
15 °C	34 min 18 s \pm 2 min
11 °C	51 min 42 s \pm 6 min 18 s
7 °C	107 min 18 s \pm 46 min 12 s

6.4.4. YcgF-(1-137)_A90W

Temperatur	Halbwertzeit
24 °C	53 s \pm 16 s
19 °C	3 min 6 s \pm 16 s
15 °C	6 min 31 s \pm 39 s
11 °C	10 min 17 s \pm 30 s
7 °C	39 min 43 s \pm 16 min 37 s

6.4.2. YcgF-(1-137)_M23I

Temperatur	Halbwertzeit
24 °C	1 min 34 s \pm 13 s
19 °C	4 min 19 s \pm 27 s
15 °C	8 min 50 s \pm 50 s
11 °C	10 min 31 s \pm 3 min 14 s
7 °C	29 min 15 s \pm 10 min 32 s

6.4.5. YcgF-(1-137)_M23I_A90W

Temperatur	Halbwertzeit
19 °C	8 s \pm 2 s
15 °C	28 s \pm 1 s
11 °C	1 min 20 s \pm 8 s
9 °C	1 min 34 s \pm 10 s
7 °C	2 min 16 s \pm 7 s
3 °C	6 min 11 s \pm 55 s

6.4.3. YcgF-(1-137)_M23L

Temperatur	Halbwertzeit
24 °C	1 min 47 s \pm 17 s
19 °C	5 min 57 s \pm 13 s
15 °C	13 min 28 s \pm 32 s
11 °C	23 min 6 s \pm 2 min 7 s
7 °C	54 min 9 s \pm 16 min 45 s

6.5. Alignment verschiedener (6-4)-DNA-Photolyasen

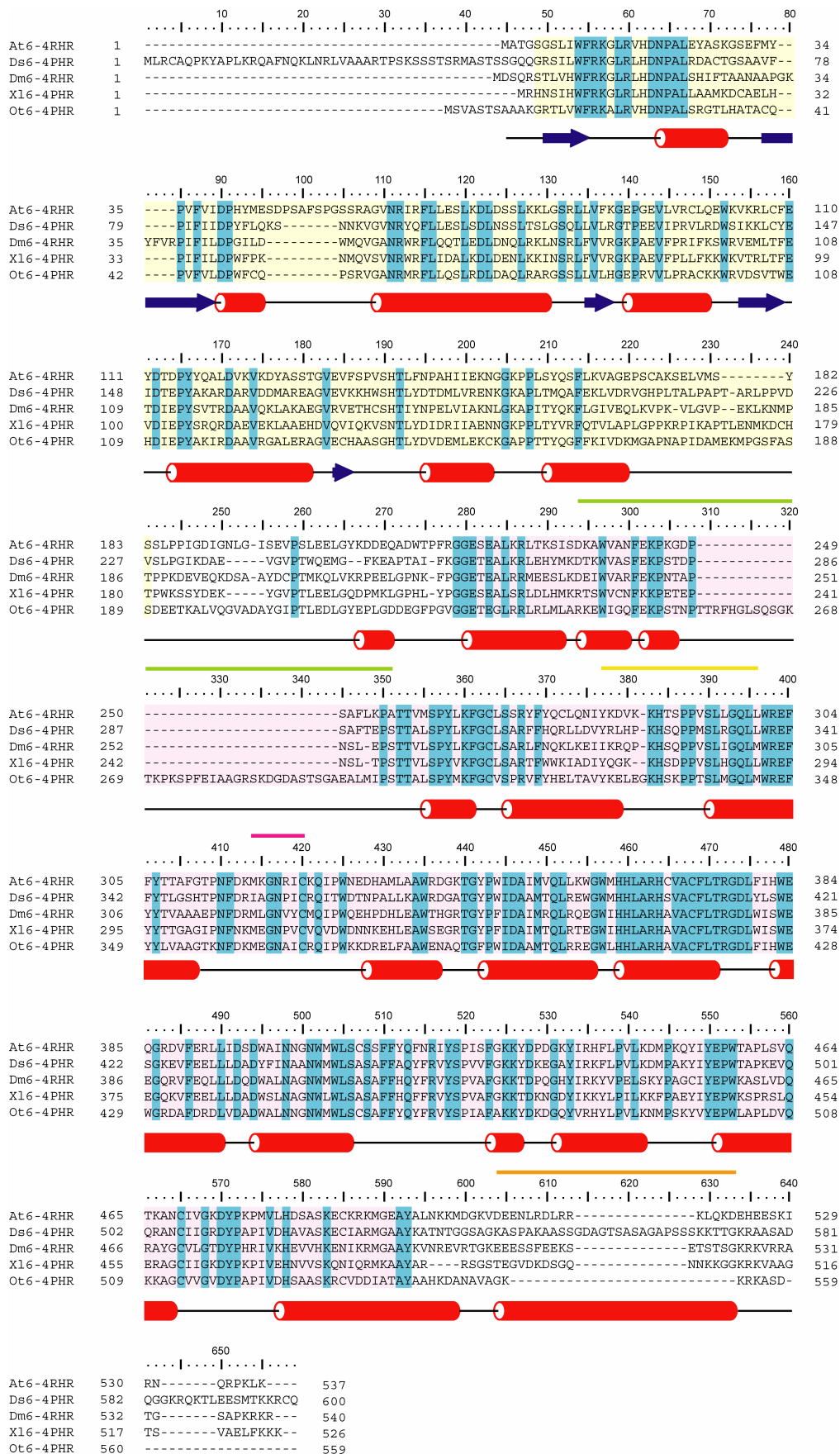


Abbildung 6.1: Multiple Sequenzalignment verschiedener (6-4)-DNA-Photolyasen. Das Sequenzalignment wurde mit ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/>) generiert. Die gezeigten Sekundärstrukturelemente entsprechen der Struktur der *A. thaliana* (6-4)-Photolyase (3F4Y). Die Sekundärstrukturelemente sind in Form von roten Zylindern (α -Helices) und blauen Pfeilen (β -Faltblätter) dargestellt. In hellgelb bzw. rosa hervorgehoben sind die Photolyase- und die FAD-Bindungsdomäne und in allen Sequenzen konservierte Aminosäurereste sind hellblau unterlegt. Die grünen, gelben, pinken und orangen Balken markieren die Phosphatbindungsstelle, das PLK-Motiv, den Schwefel-Loop und die C-terminale α -Helix. At6-4PHR: *A. thaliana* (6-4)-Photolyase (O48652), Ds6-4PHR: *D. salina* (6-4)-Photolyase (Q52Z99), Dm6-4PHR: *D. melanogaster* (6-4)-Photolyase (Q24281), Xl6-4PHR: *X. laevis* (6-4)-Photolyase (Q9I910), Ot6-4PHR: *O. tauri* (6-4)-Photolyase (Q5IFN1)

6.6. Absorptionsmaxima der *A. thaliana* (6-4)-DNA-Photolyasen

At6-4PHR Mutante	Absorptionsmaxima / nm
K246R	358, 371, 427, 447, 473
H364N_L365R	360, 374, 429, 449, 475
H368M	359, 374, 427, 449, 475
H368Q	359, 373, 427, 449, 475
H364N_L365R_H368M	358, 374, 427, 447, 472
H364N_L365R_H368Q	359, 374, 428, 448, 474
W408Y	358, 371, 427, 448, 474
F427Q	360, 374, 428, 448, 475, 582, 639
Wildtyp	359, 373, 427, 448, 474

Tabelle 6.2: Absorptionsmaxima der verschiedenen *A. thaliana* (6-4)-DNA-Photolyasen

6.7. Absorptionsspektren der *A. thaliana* (6-4)-DNA-Photolyasen

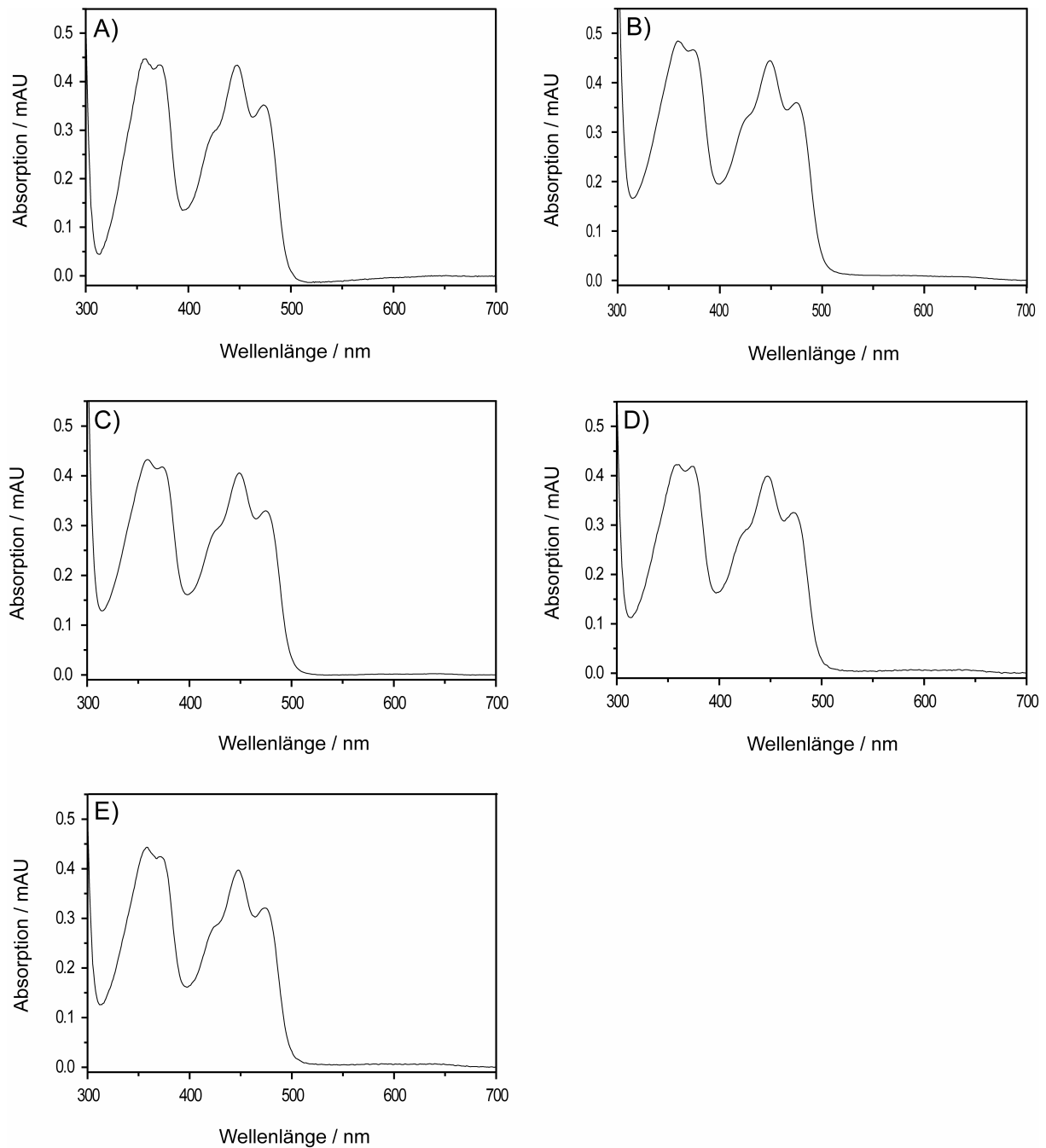


Abbildung 6.2: UV/Vis Absorptionsspektren verschiedener *A. thaliana* (6-4)-DNA-Photolyasemutanten. A) K246R, B) H368M, C) H368Q, D) H364N_L365R_H368M, E) W408Y. Die Photolyasen waren in 50 mM Na_2HPO_4 , 500 mM NaCl, pH 7.4 gelöst und die Spektren wurden bei 15 °C aufgenommen.

6.8. Photoaktivierungstest der *A. thaliana* (6-4)-DNA-Photolyasen

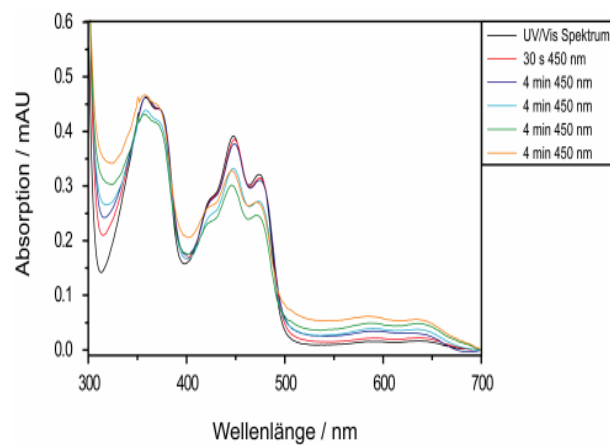


Abbildung 6.3: Absorptionsspektren der *A. thaliana* (6-4)-DNA-Photolyase zu verschiedenen Zeitpunkten nach Zugabe von 10 mM DTT und Bestrahlung mit Blaulicht. Während der Messung unter aeroben Bedingungen aggregierte die Photolyase, hier sichtbar an der starken Zunahme der Absorption im Bereich von 300 bis 350 nm. Die *A. thaliana* (6-4)-Photolyase war in 20 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 10 % Glycerin, pH 7.4 gelöst und die Spektren wurden bei 15 °C aufgenommen.

6.9. Chemische Reduktion der *A. thaliana* (6-4)-DNA-Photolyasen

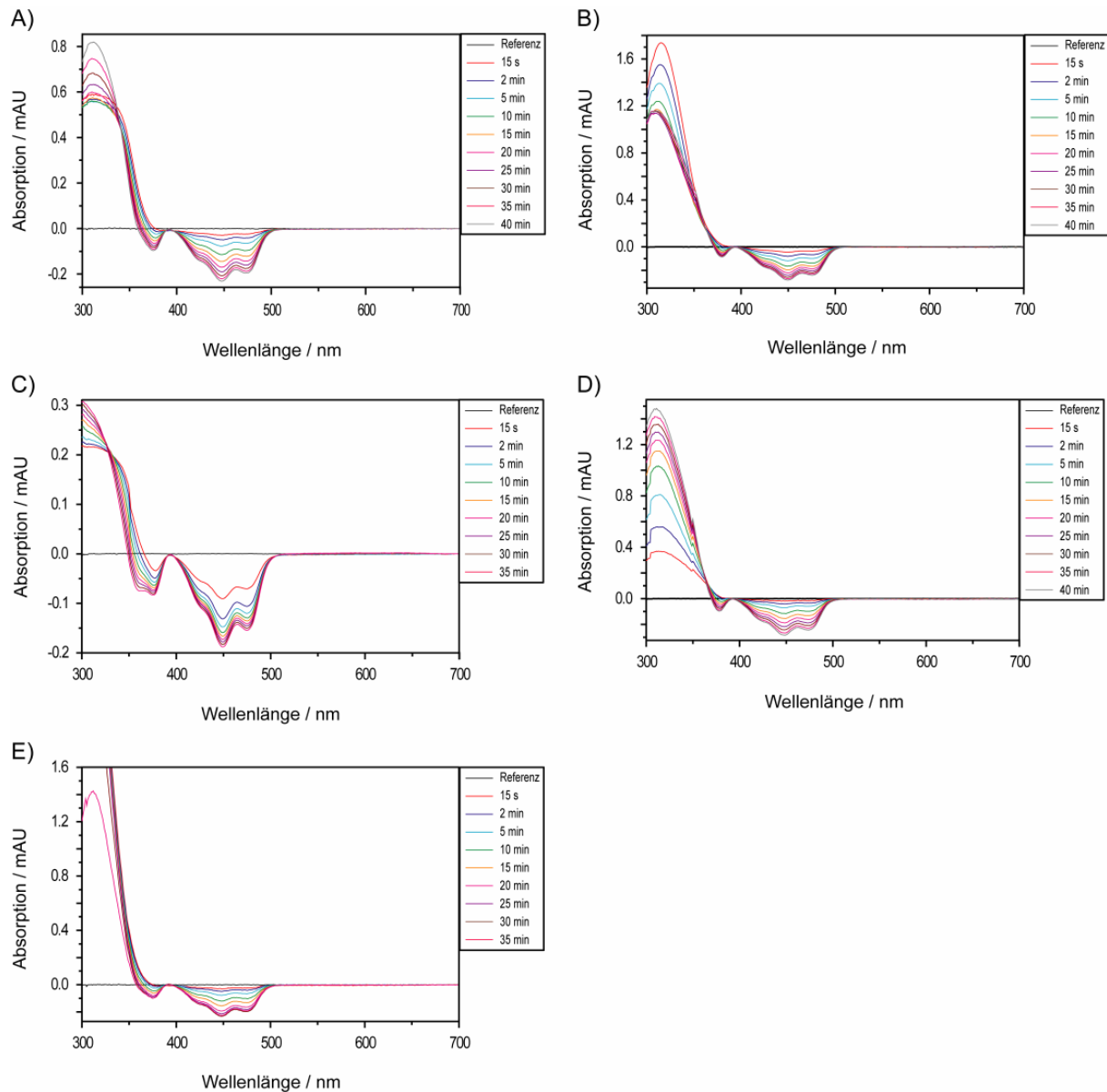


Abbildung 6.4: Differenzspektren verschiedener *A. thaliana* (6-4)-DNA-Photolyasen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Zugabe von 10 mM Natriumdithionit. A) K246R, B) H368M, C) H368Q, D) H364N_L365R_H368M, E) W408Y. Die Photolyasen (45 – 60 μ M) waren in 50 mM Na_2HPO_4 , 500 mM NaCl , pH 7.4 gelöst und die Spektren wurden bei 15 °C aufgenommen.

6.10. Intensitäten der DNA-Reparaturassays der *A. thaliana* (6-4)-DNA-Photolyasen

	Intensitäten							
	Mit <i>VspI</i> verdaute ds Ansätze				Unverdaute ds Ansätze			
<i>A. thaliana</i> (6-4)-Photolyase	0 min	10 min	30 min	60 min	0 min	10 min	30 min	60 min
K246R	1898	2010	1924	2152	1966	1934	2063	2091
H364N_L365R	9853	9299	9438	9748	8973	8738	8979	8753
H368M	1963	2011	2130	1609	2062	1940	2027	2191
H368Q	4646	4593	4476	4639	4705	4649	4244	4256
H364N_L365R_H368M	9639	9743	9513	9191	9283	8289	6335	9059
H364N_L365R_H368Q	2430	2476	2271	2510	2279	2291	2296	2308
W408Y	7875	7923	7916	7839	7604	7696	7817	7196
F427Q	6092	6349	6501	6606	6670	6590	6315	6716
Wildtyp	4585	4972	5094	5012	4555	5022	4560	4993

Tabelle 6.3: Mit dem Odyssey Infrared Imaging System (*LI-COR Biosciences*) aus 6 % Harnstoffgelen extrahierte Intensitäten der einzelnen Reparaturassays der verschiedenen *A. thaliana* (6-4)-DNA Photolyasen in Gegenwart von doppelsträngigem CPD-haltigem 50-mer Oligonukleotid.

	Intensitäten							
	Mit <i>VspI</i> verdaute ds Ansätze mit				Unverdaute ds Ansätze mit			
	Loopstruktur				Loopstruktur			
<i>A. thaliana</i> (6-4)-Photolyase	0 min	10 min	30 min	60 min	0 min	10 min	30 min	60 min
H368Q	3542	3533	3474	3502	4114	3811	3940	3990
H364N_L365R_H368Q	5289	5183	4998	5125	5505	4636	5182	5371
W408Y	3664	4135	4004	3763	4065	4174	4191	3821
Wildtyp	5123	5311	2791	5291	5012	5048	5345	5361

Tabelle 6.4: Mit dem Odyssey Infrared Imaging System (*LI-COR Biosciences*) aus 6 % Harnstoffgelen extrahierte Intensitäten der einzelnen Reparaturassays der verschiedenen *A. thaliana* (6-4)-DNA Photolyasen in Gegenwart von doppelsträngigem, eine Loopstruktur bestehend aus vier Basen enthaltenden CPD-haltigem 50-mer Oligonukleotid.

6.11. DNA-Reparaturassays der *A. thaliana* (6-4)-DNA-Photolyasen

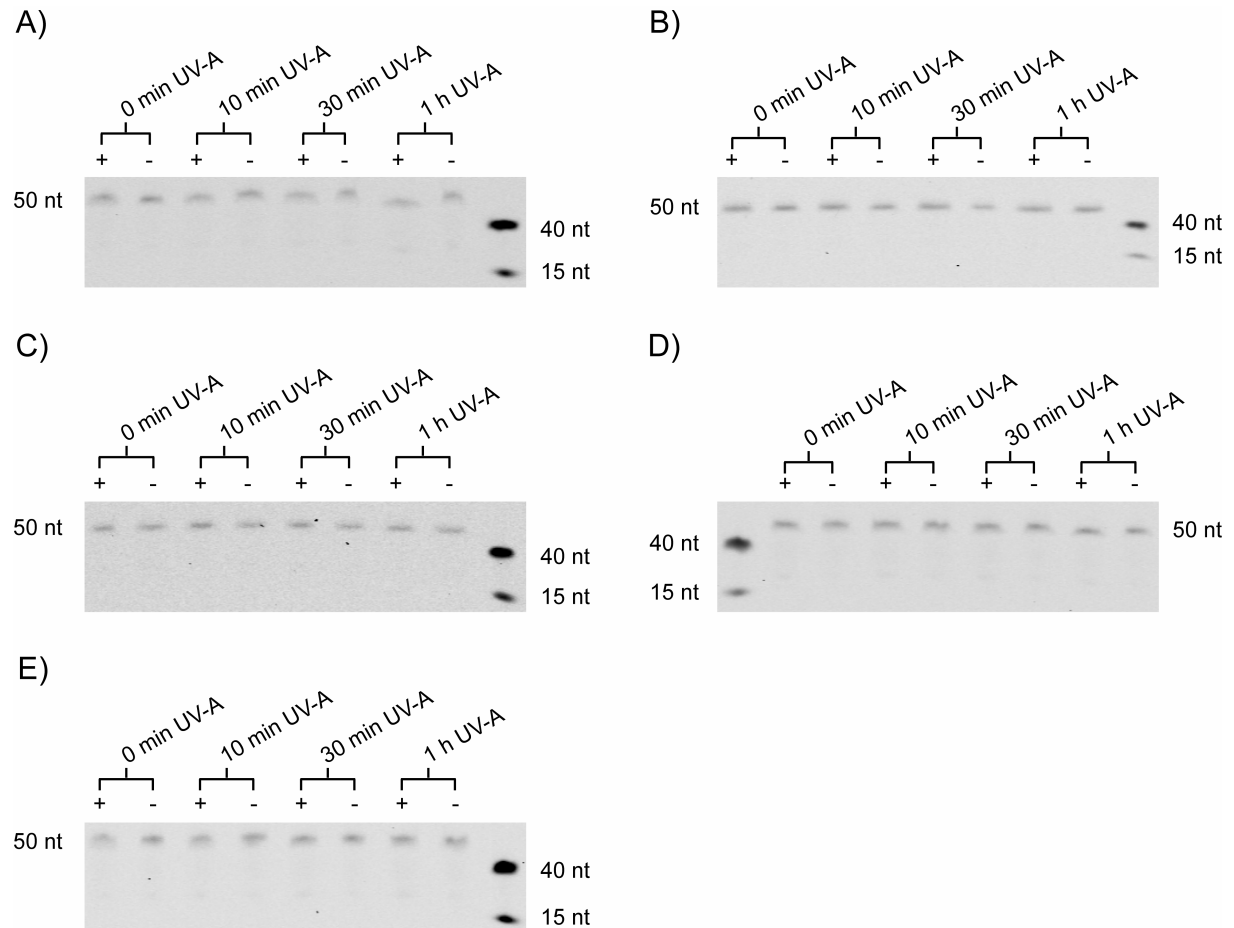


Abbildung 6.5: Reparaturassays von verschiedenen reduzierten *A. thaliana* (6-4)-DNA-Photolyasen unter Verwendung eines T<>T Dimer haltigen 50-mer Oligonukleotids. Die 6 % Harnstoffgele zeigen die A) H368Q, B) H364N_L365R_H368M, C) H364N_L365R_H368M, D) W408Y und E) F427 *A. thaliana* (6-4)-DNA-Photolyasemutanten. Proben wurden vor der Belichtung bei 365 nm, nach 10, 30 und 60 min entnommen, halbiert und jeweils ein Ansatz mit *VspI* verdaut. Am linken bzw. rechten Rand des jeweiligen Gels befindet sich ein Marker bestehend aus einem 40-mer und 15-mer IRD700 markiertem Oligonukleotid.

6.12. Kristallisationsansätze der *A. thaliana* (6-4)-DNA-Photolyase

Kristallisationsparameter	verwendete Screens
At6-4PHR: 30 / 15 mg/ mL bei 4 und 18 °C	Sigma Basic, Cryo Nextal Classic, Classic Lite, Anions
At6-4PHR: 13 mg/ mL bei 4 °C	Nextal Classic, Classic Lite, Cryo, PACT, JCSG
At6-4PHR: 20 mg/ mL bei 4 °C	Sigma Basic, Cryo Nextal Classic, Classic Lite, Anions
At6-4PHR: 5 mg/ mL bei 4 °C	Nextal MBCI, MBCII
At6-4PHR: 20 mg/ mL Zugabe von 5 % Glycerin bei 4 °C	Sigma Basic, Cryo Nextal Classic, Classic Lite, Anions
At6-4PHR: 19 mg/ mL Zugabe von 5 / 10 mM DTT bei 4 °C	Sigma Basic, Extension, Cryo Nextal Classic, Classic Lite, Anions
At6-4PHR: 13 mg/ mL Zugabe von 10 mM Na ₂ S ₂ O ₄ bei 4 °C	Nextal Classic, Classic Lite, Cryo, PACT, JCSG
At6-4PHR: 5 mg/ mL Zugabe von 100 µM 15-mer (6-4)-Oligonukleotid bei 4 °C	Nextal Classic, Classic Lite, MBCI, MBCII
At6-4PHR_H368Q: 11.2 mg/ mL bei 4 °C	Nextal Classic, Classic Lite, Cryo, PACT, JCSG, Anion
At6-4PHR_H368Q: 11.6 mg/ mL Zugabe von 5 % Glycerin bei 4 °C	Nextal Classic, Classic Lite, Cryo, PACT, JCSG, Anion

Tabelle 6.5: Kristallisationsansätze der *A. thaliana* (6-4)-DNA-Photolyasen. Die Kristallisationsansätze wurden als sitting drop im 96 well Format mit dem Cartesian MicrosysTM SQ4000 (*Genomic Solutions*) auspipettiert.

6.13. Unterlagen zum synthetischen Gen der *D. salina* (6-4)-Photolyase

Order No. **0709411** Map
 Customer **Philipps Universität Marburg: Prof. Lars-Oliver Essen**
 Name of the gene **64-PHL-Dunaliella**
 optimized for **E.coli**



22.08.2007 10:43:47

```

                                NdeI
                                NdeI      BssHII
1  CAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGCTGCGTTGCGCGCAGCCGAAATATGC
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   GTCGTCGCCGACACGCGCGCCGTCGGTATACGACGCAACGCGCGTCGGCTTTATACG
                                   L R C A Q P K Y A

61  GCCGCTGAAACGTGAGGCGTTTAACCAGAACTGAACCGTCTGGTGGCGGCAGCGCGTAC
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   CGGCGACTTTGAGTCCGCAAATTGGTCTTTGACTTGGCAGACCACCGCCGTCGCGCATG
   P L K R Q A F N Q K L N R L V A A A R T

121  CCCGAGCAAAAGCAGCAGCACCAGCCGTATGGCGAGCACCAGCTCTGGTCAACAGGGCCG
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   GGGCTCGTTTTTCGTCGTCGTTGGTCGGCATAACCGCTCGTGGTCGAGACCAGTTGTCCCGG
   P S K S S S T S R M A S T S S G Q Q G R

181  TAGCATTCTGTGGTTTCGTAAAGCCTGCGTCTGCATGATAATCCGGCGCTGCGTGATGC
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   ATCGTAAGACACCAAAGCATTTCGGGACGCGAGACGTACTATTAGGCCGCGACGCACTACG
   S I L W F R K G L R L H D N P A L R D A

241  GTGTACGGGTAGTGCGGCAGTGTTCGGATTTTATCATCGACCCGTATTTCTGCAGAA
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   CACATGCCCATCAGCCGTCACAAAGGCTAAAAATAGTAGCTGGGCATAAAAGACGTCTT
   C T G S A A V F P I F I I D P Y F L Q K

301  AAGCAACAACAAAGTGGGCGTGAACCGTTATCAGTTTCTGCTGGAAGCCTGAGCGATCT
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   TTCGTTGTTGTTTCCCGCACTTGGCAATAGTCAAAGACGACCTTTCGACTCGCTAGA
   S N N K V G V N R Y Q F L L E S L S D L

361  GAACAGCAGCCTGACCAGCCTGGGTAGCCAGCTGCTGGTTCTGCGTGGCACCCCGGAAGA
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   CTTGTCGTCGGAAGTGGTCGACCCATCGGTTCGACGACCAAGACGACCGTGGGGCCTTCT
   N S S L T S L G S Q L L V L R G T P E E

421  AGTGATTCCGCGCGTCTGCGTGATTGGAGCATTAAAAACTGTGCTATGAAATCGATAC
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   TCACTAAGGCGCGCAGGACGCACTAACCTCGTAATTTTTTGACACGATACTTTAGCTATG
   V I P R V L R D W S I K K L C Y E I D T

481  CGAACCGTATGCGAAAGCGCGTGATGCGCGTGTGGATGATATGGCGCGTGAAGCAGGTGT
   -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
   GCTTGGCATACGCTTTCGCGCACTACGCGCACACCTACTATACCGCGCACTTCGTCCACA
   E P Y A K A R D A R V D D M A R E A G V

```

541 GGAAGTGAAAAACATTGGAGCCATACCCTGTATGACACCGATATGCTGGTGCCTGAAAA
 -----+-----+-----+-----+-----+
 CCTTCACTTTTTTGTAACTCGGTATGGGACATACTGTGGCTATACGACCACGCACTTTT
E V K K H W S H T L Y D T D M L V R E N

StuI BstBI

601 CAAAGGCAAAGCCCCGCTGACCATGCAGGCCTTCGAAAACTGGTGGATCGTGTGGGCCA
 -----+-----+-----+-----+-----+
 GTTTCGGTTTCGGGGCGACTGGTACGTCCGGAAGCTTTTGTACCACCTAGCACACCCGGT
K G K A P L T M Q A F E K L V D R V G H

661 TCCGCTGACCGCGCTGCCGGCACCGACCGCGCGTCTGCCGCCGGTTGATGTGAGCCTGCC
 -----+-----+-----+-----+-----+
 AGGCGACTGGCGCGACGGCCGTGGCTGGCGCGCAGACGGCGGCCAACTACACTCGGACGG
P L T A L P A P T A R L P P V D V S L P

721 GGGCATTAAGATGCGGAAGTGGGCGTGCCGACCTGGCAGGAAATGGGCTTTAAAGAAGC
 -----+-----+-----+-----+-----+
 CCCGTAATTTCTACGCCTTCACCCGCACGGCTGGACCGTCTTTACCCGAAATTTCTTCG
G I K D A E V G V P T W Q E M G F K E A

781 GCCGACCGCGATTTTTAAAGGCGGCGAAACCGAAGCGCTGAAACGCCTGGAACACTATAT
 -----+-----+-----+-----+-----+
 CGGCTGGCGCTAAAAATTTCCGCCGCTTTGGCTTCGCGACTTTGCGGACCTTGTGATATA
P T A I F K G G E T E A L K R L E H Y M

841 GAAAGACACCAAATGGGTGGCGAGCTTTGAAAAACCGAGCACCGATCCGAGCGCGTTTAC
 -----+-----+-----+-----+-----+
 CTTTCTGTGGTTTACCCACCGCTCGAAACTTTTGGCTCGTGGCTAGGCTCGCGCAAATG
K D T K W V A S F E K P S T D P S A F T

BssHII

901 CGAACCGAGCACCAACCGCCCTGAGCCCGTATCTGAAATTTGGCTGCCTGAGCGCGCGTTT
 -----+-----+-----+-----+-----+
 GCTTGGCTCGTGGTGGCGGGACTCGGGCATAGACTTTAAACCGACGGACTCGCGCGCAAA
E P S T T A L S P Y L K F G C L S A R F

961 TTTTCATCAGCGTCTGCTGGATGTGTATCGTCTGCATCCGAAACATAGCCAGCCGCCGAT
 -----+-----+-----+-----+-----+
 AAAAGTAGTCGCAGACGACCTACACATAGCAGACGTAGGCTTTGTATCGGTCGGCGGCTA
F H Q R L L D V Y R L H P K H S Q P P M

PvuII

1021 GAGCCTGCGTGGTCAGCTGCTGTGGCGTGAATTTTTTTTATACCCTGGGCAGCCATACCCC
 -----+-----+-----+-----+-----+
 CTCGGACGCACCACTCGACGACACCGCACTTAAAAAATATGGGACCCGTCGGTATGGGG
S L R G Q L L W R E F F Y T L G S H T P

1081 GAACTTTGATCGTATTGCGGGCAATCCGATTTGCCGTCAGATTACCTGGGATACCAATCC
 -----+-----+-----+-----+-----+
 CTTGAAACTAGCATAACGCCCCTTAGGCTAAACGGCAGTCTAATGGACCCTATGGTTAGG
N F D R I A G N P I C R Q I T W D T N P

1141 GGCCCTGCTGAAAGCGTGGCGTGATGGCGCGACCGGCTATCCGTGGATTGATGCGGCGAT
 -----+-----+-----+-----+-----+
 CCGGGACGACTTTTCGACCGCACTACCGCGCTGGCCGATAGGCACCTAACTACGCCGCTA
A L L K A W R D G A T G Y P W I D A A M

PvuII

GACCCAGCTGCGTGAATGGGGCTGGATGCATCATCTGGCCCGTCATAGCGTGGCGTGCTT
 1201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CTGGGTCGACGCACTTACCCCGACCTACGTAGTAGACCGGGCAGTATCGCACCGCACGAA
T Q L R E W G W M H H L A R H S V A C F
 TCTGACCCCGTGGCGATCTGTATCTGAGCTGGGAAAGCGGCAAAGAAGTGTGTTGAAGAACT
 1261 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 AGACTGGGCACCGCTAGACATAGACTCGACCCTTTCGCCGTTTCTTCACAAACTTCTTGA
L T R G D L Y L S W E S G K E V F E E L
 GCTGCTGGATGCGGATTATTTTATTAACGCGGCGAACTGGATGTGGCTGTCTGCGAGCGC
 1321 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CGACGACCTACGCCTAATAAAAATAATTGCGCCGCTTGACCTACACCGACAGACGCTCGCG
L L D A D Y F I N A A N W M W L S A S A
 GTTTTTCGCGCAGTATTTTCGTGTGTATAGCCCGGTGGTGTGTTGGCAAAAAATACGATAA
 1381 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CAAAAAGCGCGTCATAAAAGCACACATATCGGGCCACCACAAACCGTTTTTTATGCTATT
F F A Q Y F R V Y S P V V F G K K Y D K
 AGAAGGCGCGTATATCCGTAAATTTCTGCCGGTGCTGAAAGATATGCCGGCGAAATATAT
 1441 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TCTTCGCGCATATAGGCATTTAAAGACGGCCACGACTTCTATACGGCCGCTTTATATA
E G A Y I R K F L P V L K D M P A K Y I

BssHII

TTATGAACCGTGGACCGCGCCGAAAGAAGTTCAGCAGCGCGCAACTGCATTATTGGCCG
 1501 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 AATACTTGGCACCTGGCGCGGCTTCTTCAAGTCGTCGCGCGCTTGACGTAATAACCGGC
Y E P W T A P K E V Q Q R A N C I I G R
 TGATTATCCGGCACCGATTGTGGATCATGCGGTGGCGAGCAAAGAATGCATTGCGCGTAT
 1561 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 ACTAATAGGCCGTGGCTAACACCTAGTAGCCACCGCTCGTTTCTTACGTAACGCGCATA
D Y P A P I V D H A V A S K E C I A R M

*BamHI**SacII**BamHI*

GGGTGCGGCGTATAAAGCGACCAACACCGGCGGATCCGCGGGTAAAGCGAGCCCGGCGAA
 1621 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CCCACGCGCATATTTGCTGGTTGTGGCCGCTAGGCGCCCATTTGCTCGGGCCGCTT
G A A Y K A T N T G G S A G K A S P A K

*NarI**KasI*

AGCAGCGAGCAGCGGTGATGCGGGCACCAGCGCGTCTGCGGGCGCCCCGAGCAGCAGCAA
 1681 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TCGTCGCTCGTCGCCACTACGCCGCTGGTCGCGCAGACGCCCGGGGCTCGTCGTCGTT
A A S S G D A G T S A S A G A P S S S K
 AAAAACCACCGGCAAACGTGCGGCGAGCGCGGATCAGGGCGGCAAACGTGAGAAAACCT
 1741 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
 TTTTGGTGGCCGTTTGCACGCCGCTCGCGCCTAGTCCCGCCGTTTGCAGTCTTTTGGGA
K T T G K R A A S A D Q G G K R Q K T L

AccI
EcoRI *SalI* *HindIII*
EcoRI *SacI* *HincII*

1801 GGAAGAAAGCATGACCAAAAAACGCTGCCAGTAATAAGAATTCGAGCTCCGTCGACAAGC
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
 CCTTCTTTCGTACTGGTTTTTTGCGACGGTCATTATTCTTAAGCTCGAGGCAGCTGTTTCG
 E E S M T K K R C Q * *

NotI
EagI
 TTGCGGCCGCA

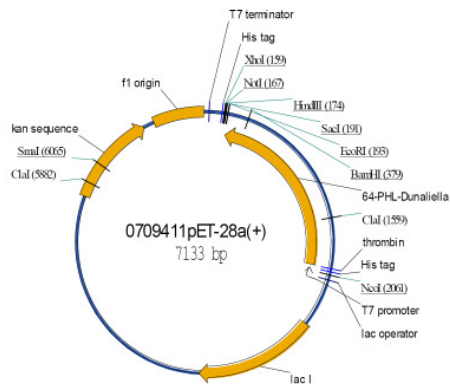
1861 -----+--
 AACGCCGGCGT



Plasmid DNA Description:

The synthetic gene 64-PHL-Dunaliella was assembled from synthetic oligonucleotides and / or PCR products. The fragment was cloned into pET28a (kanR) using NdeI and EcoRI restriction sites. The plasmid DNA was purified (Pure Yield™ Plasmid Midiprep, Promega) from transformed bacteria and concentration determined by UV spectroscopy. The final construct was verified by sequencing. The sequence congruence within the used restriction sites was 100%. See the accompanying data sheets for sequences and find the original ABI trace files as well as the assembled sequences electronically on disk. 10 µg of the plasmid preparation were lyophilized for shipping.

Plasmid Map:



Quality Assurance Documentation: 0709411

Designation: *E. coli* K12 DH10B (dam⁺ dcm⁺)
Gene Name: **64-PHL-Dunaliella**
Gene Size: 1803bp (Restriction sites not included)
Vector backbone: pET28a (kanR)
Cloning sites: NdeI / EcoRI
Quantity: ~10 µg Plasmid DNA (Promega purified)
Note: Please verify sequence after each subcloning and transformation step.
Date: 22 August 2007

Meike Brodt

Quality Control

GENEART AG

www.geneart.com

info@geneart.com

7. Danksagung:

Die vorliegende Doktorarbeit wurde in dem Zeitraum von Juni 2005 bis Oktober 2009 am Fachbereich Chemie in der Abteilung für Biochemie unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Essen angefertigt. Meinem Doktorvater danke ich sehr für die interessante und vielschichtige Aufgabenstellung, sein fortwährendes großes Interesse und die hilfreiche Unterstützung meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Batschauer danke ich für die Übernahme des Zweigutachtens, sowie für die produktive und enge Zusammenarbeit mit den Mitgliedern seines Arbeitskreises.

Bei Dr. Richard Pokorny bedanke ich mich für die Einweisung in die Bindungsstudien und für die wertvollen Diskussionsansätze auf dem Themengebiet der Photolyasen und Cryptochrome. Ebenso möchte ich mich bei allen weiteren Mitgliedern des Arbeitskreis Batschauer für die freundliche Aufnahme und Zusammenarbeit während dieser Zeit bedanken.

Herrn Dr. Erik Schleicher möchte ich für die Anfertigung der EPR-Spektren danken.

Bei Britta Meißner, Stephan Kiontke und Wolfgang Große möchte ich mich sehr für die Durchsicht dieser Arbeit und ihre kritischen Anmerkungen bedanken. Stephan und Britta danke ich zusätzlich für die Schnelleinweisung in die Geheimnisse von Pymol und für Tipps bei den Kristallisationsexperimenten.

Petra Gnau danke ich für hilfreiche Anmerkungen bei Klonierungsexperimenten und dafür, dass sie als gute Seele des Labors immer aufmunternde Worte zu verteilen wusste.

Martina Lenz danke ich für die Unterstützung bei Klonierungsarbeiten, sowie den Bindungs- und Reparaturassays.

Bei allen anderen Mitgliedern des Arbeitskreises bedanke ich mich für die lustige und schöne Zeit im Labor, im Kleinwalsertal und am Edersee. Hier möchte ich gesondert noch Wolfgang, Bodo und Maik hervorheben, die dafür gesorgt haben, dass ich vom Gottesacker wieder heil heruntergekommen bin.

Meinen Vertiefungsstudenten Stephan Kiontke, Samuel Heimann, Andre Grossmann, Jeremy Weaver, Chenjie Wu und Katrin Back danke ich für die hilfreiche Unterstützung bei einzelnen Themengebieten meiner Arbeit.

Bei meinen Freunden vom Mittwoch-Spieleabend bedanke ich mich für die Ablenkung, die mir regelmäßig geholfen hat mich wieder mit neuer Kraft meiner Arbeit zu widmen.

Meinem Freund Michael möchte ich ganz lieb für die grenzenlose Unterstützung während meiner Doktorarbeit danken.

Besonders möchte ich mich bei meinen Eltern Uwe und Monika, sowie meinen Omas: Wessel, Döring und Schroeder bedanken, die mich nicht nur während meiner Promotionszeit unterstützt und gefördert haben.

8. Literatur

1. Hellingwerf, K.J., *Key issues in the photochemistry and signalling-state formation of photosensor proteins*. J. Photochem. Photobiol. B., 2000. **54**(2-3): p. 94-102.
2. Sakai, T., et al., *Arabidopsis nph1 and npl1: blue light receptors that mediate both phototropism and chloroplast relocation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(12): p. 6969-74.
3. Wada, M., T. Kagawa, and Y. Sato, *Chloroplast movement*. Annu Rev Plant Biol, 2003. **54**: p. 455-68.
4. Borucki, B., *Proton transfer in the photoreceptors phytochrome and photoactive yellow protein*. Photochem Photobiol Sci, 2006. **5**(6): p. 553-66.
5. Spudich, J.L., et al., *Retinylidene proteins: structures and functions from archaea to humans*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2000. **16**: p. 365-92.
6. Braatsch, S., et al., *Responses of the Rhodobacter sphaeroides transcriptome to blue light under semiaerobic conditions*. J Bacteriol, 2004. **186**(22): p. 7726-35.
7. Singh, A.H., et al., *Discovering functional novelty in metagenomes: examples from light-mediated processes*. J Bacteriol, 2009. **191**(1): p. 32-41.
8. Sancar, A., *Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors*. Chem Rev, 2003. **103**(6): p. 2203-37.
9. van der Horst, M.A. and K.J. Hellingwerf, *Photoreceptor proteins, "star actors of modern times": a review of the functional dynamics in the structure of representative members of six different photoreceptor families*. Acc Chem Res, 2004. **37**(1): p. 13-20.
10. Salomon, M., et al., *Photochemical and mutational analysis of the FMN-binding domains of the plant blue light receptor, phototropin*. Biochemistry, 2000. **39**(31): p. 9401-10.
11. Harper, S.M., L.C. Neil, and K.H. Gardner, *Structural basis of a phototropin light switch*. Science, 2003. **301**(5639): p. 1541-4.
12. Harper, S.M., J.M. Christie, and K.H. Gardner, *Disruption of the LOV-Jalpha helix interaction activates phototropin kinase activity*. Biochemistry, 2004. **43**(51): p. 16184-92.
13. Gomelsky, M. and G. Klug, *BLUF: a novel FAD-binding domain involved in sensory transduction in microorganisms*. Trends Biochem Sci, 2002. **27**(10): p. 497-500.
14. Barends, T.R., et al., *Structure and mechanism of a bacterial light-regulated cyclic nucleotide phosphodiesterase*. Nature, 2009. **459**(7249): p. 1015-8.
15. Bonetti, C., et al., *Hydrogen bond switching among flavin and amino acid side chains in the BLUF photoreceptor observed by ultrafast infrared spectroscopy*. Biophys J, 2008. **95**(10): p. 4790-802.
16. Tschowri, N., S. Busse, and R. Hengge, *The BLUF-EAL protein YcgF acts as a direct anti-repressor in a blue-light response of Escherichia coli*. Genes Dev, 2009. **23**(4): p. 522-34.
17. Braatsch, S., et al., *A single flavoprotein, AppA, integrates both redox and light signals in Rhodobacter sphaeroides*. Mol Microbiol, 2002. **45**(3): p. 827-36.
18. Iseki, M., et al., *A blue-light-activated adenylyl cyclase mediates photoavoidance in Euglena gracilis*. Nature, 2002. **415**(6875): p. 1047-51.
19. Masuda, S., et al., *Light-induced structural changes in a putative blue-light receptor with a novel FAD binding fold sensor of blue-light using FAD (BLUF); Slr1694 of synechocystis sp. PCC6803*. Biochemistry, 2004. **43**(18): p. 5304-13.

20. Fukushima, Y., et al., *Primary intermediate in the photocycle of a blue-light sensory BLUF FAD-protein, Tll0078, of Thermosynechococcus elongatus BP-I*. Biochemistry, 2005. **44**(13): p. 5149-58.
21. Jung, A., et al., *Structure of a bacterial BLUF photoreceptor: insights into blue light-mediated signal transduction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(35): p. 12350-5.
22. Masuda, S. and C.E. Bauer, *AppA is a blue light photoreceptor that antirepresses photosynthesis gene expression in Rhodobacter sphaeroides*. Cell, 2002. **110**(5): p. 613-23.
23. Wu, Q. and K. Gardner, *Structure and insight into blue light-induced changes in the BlrP1 BLUF domain*. Biochemistry, 2009.
24. Rajagopal, S., et al., *Purification and initial characterization of a putative blue light-regulated phosphodiesterase from Escherichia coli*. Photochem Photobiol, 2004. **80**(3): p. 542-7.
25. Anderson, S., et al., *Structure of a novel photoreceptor, the BLUF domain of AppA from Rhodobacter sphaeroides*. Biochemistry, 2005. **44**(22): p. 7998-8005.
26. Kita, A., et al., *Structure of a cyanobacterial BLUF protein, Tll0078, containing a novel FAD-binding blue light sensor domain*. J Mol Biol, 2005. **349**(1): p. 1-9.
27. Yuan, H., et al., *Crystal structures of the Synechocystis photoreceptor Slr1694 reveal distinct structural states related to signaling*. Biochemistry, 2006. **45**(42): p. 12687-94.
28. Tanaka, K., et al., *Oligomeric-state-dependent conformational change of the BLUF protein TePixD (Tll0078)*. J Mol Biol, 2009. **386**(5): p. 1290-300.
29. Hasegawa, K., S. Masuda, and T.A. Ono, *Structural intermediate in the photocycle of a BLUF (sensor of blue light using FAD) protein Slr1694 in a Cyanobacterium Synechocystis sp. PCC6803*. Biochemistry, 2004. **43**(47): p. 14979-86.
30. Kraft, B.J., et al., *Spectroscopic and mutational analysis of the blue-light photoreceptor AppA: a novel photocycle involving flavin stacking with an aromatic amino acid*. Biochemistry, 2003. **42**(22): p. 6726-34.
31. Masuda, S., K. Hasegawa, and T.A. Ono, *Adenosine diphosphate moiety does not participate in structural changes for the signaling state in the sensor of blue-light using FAD domain of AppA*. FEBS Lett, 2005. **579**(20): p. 4329-32.
32. Masuda, S. and T.A. Ono, *Biochemical characterization of the major adenylyl cyclase, Cya1, in the cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803*. FEBS Lett, 2004. **577**(1-2): p. 255-8.
33. Unno, M., et al., *Light-induced structural changes in the active site of the BLUF domain in AppA by Raman spectroscopy*. J Phys Chem B, 2005. **109**(25): p. 12620-6.
34. Stelling, A.L., et al., *Ultrafast structural dynamics in BLUF domains: transient infrared spectroscopy of AppA and its mutants*. J Am Chem Soc, 2007. **129**(50): p. 15556-64.
35. Shibata, Y., et al., *Acceleration of electron-transfer-induced fluorescence quenching upon conversion to the signaling state in the blue-light receptor, TePixD, from Thermosynechococcus elongatus*. J Phys Chem B, 2009. **113**(23): p. 8192-8.
36. Gauden, M., et al., *On the role of aromatic side chains in the photoactivation of BLUF domains*. Biochemistry, 2007. **46**(25): p. 7405-15.
37. Gauden, M., et al., *Hydrogen-bond switching through a radical pair mechanism in a flavin-binding photoreceptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(29): p. 10895-900.

38. Grinstead, J.S., et al., *Light-induced flipping of a conserved glutamine sidechain and its orientation in the AppA BLUF domain*. J Am Chem Soc, 2006. **128**(47): p. 15066-7.
39. Masuda, S., et al., *The critical role of a hydrogen bond between Gln63 and Trp104 in the blue-light sensing BLUF domain that controls AppA activity*. J Mol Biol, 2007. **368**(5): p. 1223-30.
40. Unno, M., et al., *Orientation of a key glutamine residue in the BLUF domain from AppA revealed by mutagenesis, spectroscopy, and quantum chemical calculations*. J Am Chem Soc, 2006. **128**(17): p. 5638-9.
41. Domratcheva, T., et al., *Molecular models predict light-induced glutamine tautomerization in BLUF photoreceptors*. Biophys J, 2008. **94**(10): p. 3872-9.
42. Sadeghian, K., M. Bocola, and M. Schutz, *A conclusive mechanism of the photoinduced reaction cascade in blue light using flavin photoreceptors*. J Am Chem Soc, 2008. **130**(37): p. 12501-13.
43. Jung, A., et al., *Crystal structures of the AppA BLUF domain photoreceptor provide insights into blue light-mediated signal transduction*. J Mol Biol, 2006. **362**(4): p. 717-32.
44. Hasegawa, K., S. Masuda, and T.A. Ono, *Light induced structural changes of a full-length protein and its BLUF domain in YcgF(Blrp), a blue-light sensing protein that uses FAD (BLUF)*. Biochemistry, 2006. **45**(11): p. 3785-93.
45. Schroeder, C., et al., *Influence of a joining helix on the BLUF domain of the YcgF photoreceptor from Escherichia coli*. Chembiochem, 2008. **9**(15): p. 2463-73.
46. Gauden, M., et al., *Photocycle of the flavin-binding photoreceptor AppA, a bacterial transcriptional antirepressor of photosynthesis genes*. Biochemistry, 2005. **44**(10): p. 3653-62.
47. Masuda, S., K. Hasegawa, and T.A. Ono, *Light-induced structural changes of apoprotein and chromophore in the sensor of blue light using FAD (BLUF) domain of AppA for a signaling state*. Biochemistry, 2005. **44**(4): p. 1215-24.
48. Obanayama, K., et al., *Structures of the chromophore binding sites in BLUF domains as studied by molecular dynamics and quantum chemical calculations*. Photochem Photobiol, 2008. **84**(4): p. 1003-10.
49. Masuda, S., et al., *Crucial role in light signal transduction for the conserved Met93 of the BLUF protein PixD/Slr1694*. Plant Cell Physiol, 2008. **49**(10): p. 1600-6.
50. Grinstead, J.S., et al., *The solution structure of the AppA BLUF domain: insight into the mechanism of light-induced signaling*. Chembiochem, 2006. **7**(1): p. 187-93.
51. van der Horst, M.A., J. Key, and K.J. Hellingwerf, *Photosensing in chemotrophic, non-phototrophic bacteria: let there be light sensing too*. Trends Microbiol, 2007. **15**(12): p. 554-62.
52. Schroeder, C., *Charakterisierung der Blaulichtrezeptordomäne YcgF aus Escherichia coli*. Diplomarbeit, 2005.
53. Watson, J.D. and F.H. Crick, *Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid*. Nature, 1953. **171**(4356): p. 737-8.
54. Lewin, B., *Gene Lehrbuch der molekularen Genetik*. Weinheim, VCH Verlagsgesellschaft, 1991.
55. Hubscher, U., G. Maga, and S. Spadari, *Eukaryotic DNA polymerases*. Annu Rev Biochem, 2002. **71**: p. 133-63.
56. Goosen, N. and G.F. Moolenaar, *Repair of UV damage in bacteria*. DNA Repair (Amst), 2008. **7**(3): p. 353-79.

-
57. Jun, S.H., T.G. Kim, and C. Ban, *DNA mismatch repair system. Classical and fresh roles*. FEBS J, 2006. **273**(8): p. 1609-19.
 58. Li, X. and W.D. Heyer, *Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance*. Cell Res, 2008. **18**(1): p. 99-113.
 59. Ravanat, J.L., T. Douki, and J. Cadet, *Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components*. J Photochem Photobiol B, 2001. **63**(1-3): p. 88-102.
 60. Tudek, B., S. Boiteux, and J. Laval, *Biological properties of imidazole ring-opened N7-methylguanine in M13mp18 phage DNA*. Nucleic Acids Res, 1992. **20**(12): p. 3079-84.
 61. Douki, T. and J. Cadet, *Individual determination of the yield of the main UV-induced dimeric pyrimidine photoproducts in DNA suggests a high mutagenicity of CC photolesions*. Biochemistry, 2001. **40**(8): p. 2495-501.
 62. Friedberg, E.C., G.C. Walker, and W. Siede, *DNA Repair and Mutagenesis*. ASM Press, Washington, DC, 1995.
 63. Lindahl, T., *Instability and decay of the primary structure of DNA*. Nature, 1993. **362**(6422): p. 709-15.
 64. Taylor, J.S., *DNA, sunlight and skin cancer*. Pure & Appl. Chem., 1995. **67**(1): p. 183-190.
 65. Matsumura, Y. and H.N. Ananthaswamy, *Molecular mechanisms of photocarcinogenesis*. Front Biosci, 2002. **7**: p. d765-83.
 66. Trautinger, F., *Mechanisms of photodamage of the skin and its functional consequences for skin ageing*. Clin Exp Dermatol, 2001. **26**(7): p. 573-7.
 67. Setlow, R.B. and W.L. Carrier, *Pyrimidine dimers in ultraviolet-irradiated DNA's*. J Mol Biol, 1966. **17**(1): p. 237-54.
 68. Heelis, P.F., et al., *The photo repair of pyrimidine dimers by DNA photolyase and model systems*. J Photochem Photobiol B, 1993. **17**(3): p. 219-28.
 69. Rahn, R.O. and J.L. Hosszu, *Photochemical studies of thymine in ice*. Photochem Photobiol, 1969. **10**(2): p. 131-7.
 70. Wang, S.Y. and A.J. Varghese, *Cytosine-thymine addition product from DNA irradiated with ultraviolet light*. Biochem Biophys Res Commun, 1967. **29**(4): p. 543-9.
 71. Weber, S., *Light-driven enzymatic catalysis of DNA repair: a review of recent biophysical studies on photolyase*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1707**(1): p. 1-23.
 72. Ozturk, N., et al., *Purification and characterization of a type III photolyase from *Caulobacter crescentus**. Biochemistry, 2008. **47**(39): p. 10255-61.
 73. Essen, L.O. and T. Klar, *Light-driven DNA repair by photolyases*. Cell Mol Life Sci, 2006. **63**(11): p. 1266-77.
 74. Schroder, H.C., et al., *Molecular and functional analysis of the (6-4) photolyase from the hexactinellid *Aphrocallistes vastus**. Biochim Biophys Acta, 2003. **1651**(1-2): p. 41-9.
 75. Hitomi, K., et al., *Binding and catalytic properties of *Xenopus* (6-4) photolyase*. J Biol Chem, 1997. **272**(51): p. 32591-8.
 76. Yi, Y., et al., *Cloning and sequence analysis of the gene encoding (6-4)photolyase from *Dunaliella salina**. Biotechnol Lett, 2006. **28**(5): p. 309-14.
 77. Todo, T., et al., *Similarity among the *Drosophila* (6-4)photolyase, a human photolyase homolog, and the DNA photolyase-blue-light photoreceptor family*. Science, 1996. **272**(5258): p. 109-12.

-
78. Nakajima, S., et al., *Cloning and characterization of a gene (UVR3) required for photorepair of 6-4 photoproducts in Arabidopsis thaliana*. Nucleic Acids Res, 1998. **26**(2): p. 638-44.
 79. Kobayashi, Y., et al., *Molecular analysis of zebrafish photolyase/cryptochrome family: two types of cryptochromes present in zebrafish*. Genes Cells, 2000. **5**(9): p. 725-38.
 80. Johnson, J.L., et al., *Identification of the second chromophore of Escherichia coli and yeast DNA photolyases as 5,10-methenyltetrahydrofolate*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(7): p. 2046-50.
 81. Glas, A.F., et al., *The archaeal cofactor F0 is a light-harvesting antenna chromophore in eukaryotes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(28): p. 11540-5.
 82. Kort, R., et al., *DNA apophotolyase from Anacystis nidulans: 1.8 Å structure, 8-HDF reconstitution and X-ray-induced FAD reduction*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2004. **60**(Pt 7): p. 1205-13.
 83. Fujihashi, M., et al., *Crystal structure of archaeal photolyase from Sulfolobus tokodaii with two FAD molecules: implication of a novel light-harvesting cofactor*. J Mol Biol, 2007. **365**(4): p. 903-10.
 84. Klar, T., et al., *Natural and non-natural antenna chromophores in the DNA photolyase from Thermus thermophilus*. Chembiochem, 2006. **7**(11): p. 1798-806.
 85. Hitomi, K., et al., *Functional motifs in the (6-4) photolyase crystal structure make a comparative framework for DNA repair photolyases and clock cryptochromes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(17): p. 6962-7.
 86. Muller, M. and T. Carell, *Structural biology of DNA photolyases and cryptochromes*. Curr Opin Struct Biol, 2009. **19**(3): p. 277-85.
 87. Cheung, M.S., et al., *Pathways of electron transfer in Escherichia coli DNA photolyase: Trp306 to FADH*. Biophys J, 1999. **76**(3): p. 1241-9.
 88. Kim, S.T., P.F. Heelis, and A. Sancar, *Energy transfer (deazaflavin-->FADH2) and electron transfer (FADH2-->T <-> T) kinetics in Anacystis nidulans photolyase*. Biochemistry, 1992. **31**(45): p. 11244-8.
 89. Saxena, C., et al., *Ultrafast dynamics of resonance energy transfer in cryptochrome*. J Am Chem Soc, 2005. **127**(22): p. 7984-5.
 90. Heelis, P.F. and A. Sancar, *Photochemical properties of Escherichia coli DNA photolyase: a flash photolysis study*. Biochemistry, 1986. **25**(25): p. 8163-6.
 91. Aubert, C., et al., *Intraprotein radical transfer during photoactivation of DNA photolyase*. Nature, 2000. **405**(6786): p. 586-90.
 92. Kao, Y.T., et al., *Ultrafast dynamics and anionic active states of the flavin cofactor in cryptochrome and photolyase*. J Am Chem Soc, 2008. **130**(24): p. 7695-701.
 93. Lukacs, A., et al., *Electron hopping through the 15 Å triple tryptophan molecular wire in DNA photolyase occurs within 30 ps*. J Am Chem Soc, 2008. **130**(44): p. 14394-5.
 94. Weber, S., et al., *Photoactivation of the flavin cofactor in Xenopus laevis (6 - 4) photolyase: observation of a transient tyrosyl radical by time-resolved electron paramagnetic resonance*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(3): p. 1319-22.
 95. Saxena, C., A. Sancar, and D.P. Zhong, *Femtosecond dynamics of DNA photolyase: energy transfer of antenna initiation and electron transfer of cofactor reduction*. J. Phys. Chem. B, 2004. **108**: p. 18026-18033.
 96. Husain, I. and A. Sancar, *Binding of E. coli DNA photolyase to a defined substrate containing a single T mean value of T dimer*. Nucleic Acids Res, 1987. **15**(3): p. 1109-20.

97. Kiener, A., et al., *Purification and properties of Methanobacterium thermoautotrophicum DNA photolyase*. J Biol Chem, 1989. **264**(23): p. 13880-7.
98. Payne, G., et al., *Reconstitution of Escherichia coli photolyase with flavins and flavin analogues*. Biochemistry, 1990. **29**(24): p. 5706-11.
99. Sancar, G.B., et al., *Action mechanism of Escherichia coli DNA photolyase. III. Photolysis of the enzyme-substrate complex and the absolute action spectrum*. J Biol Chem, 1987. **262**(1): p. 492-8.
100. Husain, I., et al., *Mechanism of damage recognition by Escherichia coli DNA photolyase*. J Biol Chem, 1987. **262**(27): p. 13188-97.
101. Payne, G. and A. Sancar, *Absolute action spectrum of E-FADH₂ and E-FADH₂-MTHF forms of Escherichia coli DNA photolyase*. Biochemistry, 1990. **29**(33): p. 7715-27.
102. Park, H., et al., *Crystal structure of a DNA decamer containing a cis-syn thymine dimer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(25): p. 15965-70.
103. Mees, A., et al., *Crystal structure of a photolyase bound to a CPD-like DNA lesion after in situ repair*. Science, 2004. **306**(5702): p. 1789-93.
104. Maul, M.J., et al., *Crystal structure and mechanism of a DNA (6-4) photolyase*. Angew Chem Int Ed Engl, 2008. **47**(52): p. 10076-80.
105. Vande Berg, B.J. and G.B. Sancar, *Evidence for dinucleotide flipping by DNA photolyase*. J Biol Chem, 1998. **273**(32): p. 20276-84.
106. Komori, H., et al., *Crystal structure of thermostable DNA photolyase: pyrimidine-dimer recognition mechanism*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(24): p. 13560-5.
107. Kavakli, I.H. and A. Sancar, *Analysis of the role of intraprotein electron transfer in photoreactivation by DNA photolyase in vivo*. Biochemistry, 2004. **43**(48): p. 15103-10.
108. Hitomi, K., et al., *Role of two histidines in the (6-4) photolyase reaction*. J Biol Chem, 2001. **276**(13): p. 10103-9.
109. Li, J., et al., *Characteristic structure and environment in FAD cofactor of (6-4) photolyase along function revealed by resonance Raman spectroscopy*. J Phys Chem B, 2006. **110**(33): p. 16724-32.
110. Hosseini Tafreshi, A. and M. Shariati, *Dunaliella biotechnology: methods and applications*. Journal of Applied Microbiology, 2009. **107**: p. 14-35.
111. Yan Lv, X., et al., *Photoreactivation of (6-4) photolyase in Dunaliella salina*. FEMS Microbiol Lett, 2008. **283**(1): p. 42-6.
112. Lin, C. and T. Todo, *The cryptochromes*. Genome Biol, 2005. **6**(5): p. 220.
113. Selby, C.P. and A. Sancar, *A cryptochrome/photolyase class of enzymes with single-stranded DNA-specific photolyase activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(47): p. 17696-700.
114. Langmesser, S., et al., *Interaction of circadian clock proteins PER2 and CRY with BMAL1 and CLOCK*. BMC Mol Biol, 2008. **9**: p. 41.
115. Li, Q.H. and H.Q. Yang, *Cryptochrome signaling in plants*. Photochem Photobiol, 2007. **83**(1): p. 94-101.
116. Yoshii, T., M. Ahmad, and C. Helfrich-Forster, *Cryptochrome mediates light-dependent magnetosensitivity of Drosophila's circadian clock*. PLoS Biol, 2009. **7**(4): p. e1000086.
117. Pokorny, R., et al., *Recognition and repair of UV lesions in loop structures of duplex DNA by DASH-type cryptochrome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(52): p. 21023-7.

118. Brudler, R., et al., *Identification of a new cryptochrome class. Structure, function, and evolution*. Mol Cell, 2003. **11**(1): p. 59-67.
119. Daiyasu, H., et al., *Identification of cryptochrome DASH from vertebrates*. Genes Cells, 2004. **9**(5): p. 479-95.
120. Kleine, T., P. Lockhart, and A. Batschauer, *An Arabidopsis protein closely related to Synechocystis cryptochrome is targeted to organelles*. Plant J, 2003. **35**(1): p. 93-103.
121. Cashmore, A.R., et al., *Cryptochromes: blue light receptors for plants and animals*. Science, 1999. **284**(5415): p. 760-5.
122. Partch, C.L., et al., *Role of structural plasticity in signal transduction by the cryptochrome blue-light photoreceptor*. Biochemistry, 2005. **44**(10): p. 3795-805.
123. Partch, C.L. and A. Sancar, *Photochemistry and photobiology of cryptochrome blue-light photopigments: the search for a photocycle*. Photochem Photobiol, 2005. **81**(6): p. 1291-304.
124. Klar, T., et al., *Cryptochrome 3 from Arabidopsis thaliana: structural and functional analysis of its complex with a folate light antenna*. J Mol Biol, 2007. **366**(3): p. 954-64.
125. Banerjee, R., et al., *The signaling state of Arabidopsis cryptochrome 2 contains flavin semiquinone*. J Biol Chem, 2007. **282**(20): p. 14916-22.
126. Bouly, J.P., et al., *Cryptochrome blue light photoreceptors are activated through interconversion of flavin redox states*. J Biol Chem, 2007. **282**(13): p. 9383-91.
127. Ozturk, N., et al., *Animal type 1 cryptochromes. Analysis of the redox state of the flavin cofactor by site-directed mutagenesis*. J Biol Chem, 2008. **283**(6): p. 3256-63.
128. Song, S.H., et al., *Formation and function of flavin anion radical in cryptochrome 1 blue-light photoreceptor of monarch butterfly*. J Biol Chem, 2007. **282**(24): p. 17608-12.
129. Song, S.H., et al., *Absorption and fluorescence spectroscopic characterization of cryptochrome 3 from Arabidopsis thaliana*. J Photochem Photobiol B, 2006. **85**(1): p. 1-16.
130. Byrdin, M., et al., *Intraprotein electron transfer and proton dynamics during photoactivation of DNA photolyase from E. coli: review and new insights from an "inverse" deuterium isotope effect*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1655**(1-3): p. 64-70.
131. Sambrook, F., E.F. Fritsch, and T. Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
132. Birnboim, H.C. and J. Doly, *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA*. Nucleic Acids Res, 1979. **7**(6): p. 1513-23.
133. Mullis, K.B. and F.A. Faloona, *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction*. Methods Enzymol, 1987. **155**: p. 335-50.
134. *Manual of the Phusion High-Fidelity DNA Polymerase*. Finnzymes, 2009.
135. *QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit*. Stratagene, 2007.
136. Mülhardt, C., *Der Experimentator: Molekularbiologie / Genomics* Spektrum Akademischer Verlag, 2008. **6**.
137. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(12): p. 5463-7.
138. Dagert, M. and S.D. Ehrlich, *Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of Escherichia coli cells*. Gene, 1979. **6**(1): p. 23-8.
139. Dower, W.J., J.F. Miller, and C.W. Ragsdale, *High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation*. Nucleic Acids Res, 1988. **16**(13): p. 6127-45.

140. Grossman, T.H., et al., *Spontaneous cAMP-dependent derepression of gene expression in stationary phase plays a role in recombinant expression instability*. Gene, 1998. **209**(1-2): p. 95-103.
141. Kelley, K.C., et al., *Regulation of sCD4-183 gene expression from phage-T7-based vectors in Escherichia coli*. Gene, 1995. **156**(1): p. 33-6.
142. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
143. Smith, P.K., et al., *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. Anal Biochem, 1985. **150**(1): p. 76-85.
144. Edelhoch, H., *Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins*. Biochemistry, 1967. **6**(7): p. 1948-54.
145. Gill, S.C. and P.H. von Hippel, *Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data*. Anal Biochem, 1989. **182**(2): p. 319-26.
146. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
147. Bennett, J. and K.J. Scott, *Quantitative staining of fraction I protein in polyacrylamide gels using Coomassie brilliant blue*. Anal Biochem, 1971. **43**(1): p. 173-82.
148. Albrecht, S., H. Brandl, and T. Zimmermann, *Chemolumineszenz*. Hüthig Verlag, Heidelberg 1996.
149. Kleiner, O., et al., *Class II DNA photolyase from Arabidopsis thaliana contains FAD as a cofactor*. Eur J Biochem, 1999. **264**(1): p. 161-7.
150. Koziol, J., *[132] Fluorometric analyses of riboflavin and its coenzymes*. Methods Enzymol, 1971. **18**: p. 253-285.
151. Carrington, A. and A.D. McLachlan, *Introduction to Magnetic Resonance*. Harper International Edition, New York, 1969.
152. Holtzhauer, M., *Methoden der Proteinanalytik*. Springer-Verlag, Berlin, 1996.
153. Atherton, N.M., *Principles of Electron Spin Resonance*. Ellis Horwood LTD., Chichester, 1993.
154. Schleicher, E., et al., *On the reaction mechanism of adduct formation in LOV domains of the plant blue-light receptor phototropin*. J Am Chem Soc, 2004. **126**(35): p. 11067-76.
155. Kowalczyk, R.M., et al., *The photoinduced triplet of flavins and its protonation states*. J Am Chem Soc, 2004. **126**(36): p. 11393-9.
156. Gindt, Y.M., et al., *Origin of the transient electron paramagnetic resonance signals in DNA photolyase*. Biochemistry, 1999. **38**(13): p. 3857-66.
157. Jancarik, J., et al., *Crystallization and preliminary X-ray diffraction study of the ligand-binding domain of the bacterial chemotaxis-mediating aspartate receptor of Salmonella typhimurium*. J Mol Biol, 1991. **221**(1): p. 31-4.
158. Arnold, K., et al., *The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling*. Bioinformatics, 2006. **22**(2): p. 195-201.
159. Reyna, M.M., *Spectroscopic characterization of the E.coli YcgF BLUF domain*. Diplomarbeit, 2005.
160. Kelly, S.M. and N.C. Price, *The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function*. Curr Protein Pept Sci, 2000. **1**(4): p. 349-84.
161. Shiga, K. and L.H. Piette, *Triplet state studies of flavins by electron paramagnetic resonance II*. Photochem Photobiol, 1962. **3**: p. 223-230.
162. Shiga, T. and L.H. Piette, *Triplet state studies of flavins by electron paramagnetic resonance I* Photochem Photobiol, 1964. **3**: p. 213-222.

-
163. Park, H.W., et al., *Crystal structure of DNA photolyase from Escherichia coli*. Science, 1995. **268**(5219): p. 1866-72.
164. Eker, A.P., et al., *DNA photoreactivating enzyme from the cyanobacterium Anacystis nidulans*. J Biol Chem, 1990. **265**(14): p. 8009-15.
165. Malhotra, K., S.T. Kim, and A. Sancar, *Characterization of a medium wavelength type DNA photolyase: purification and properties of photolyase from Bacillus firmus*. Biochemistry, 1994. **33**(29): p. 8712-8.
166. Worthington, E.N., et al., *Purification and characterization of three members of the photolyase/cryptochrome family blue-light photoreceptors from Vibrio cholerae*. J Biol Chem, 2003. **278**(40): p. 39143-54.
167. Li, J., et al., *Similarities and differences between cyclobutane pyrimidine dimer photolyase and (6-4) photolyase as revealed by resonance Raman spectroscopy: Electron transfer from the FAD cofactor to ultraviolet-damaged DNA*. J Biol Chem, 2006. **281**(35): p. 25551-9.
168. Massey, V., et al., *The reactivity of flavoproteins with sulfite. Possible relevance to the problem of oxygen reactivity*. J Biol Chem, 1969. **244**(15): p. 3999-4006.
169. Muller, F. and V. Massey, *Flavin-sulfite complexes and their structures*. J Biol Chem, 1969. **244**(15): p. 4007-16.
170. Orth, C., *Strukturbasierte funktionale Veränderungen von Mitgliedern der Photolyase/Cryptochrom-Familie*. Diplomarbeit, 2009.
171. Avron, M. and A. Ben-Amotz, *Dunaliella Physiology, Biochemistry and Biotechnology*. CRC Press, 1973.
172. Pick, U., L. Karni, and M. Avron, *Determination of Ion Content and Ion Fluxes in the Halotolerant Alga Dunaliella salina*. Plant Physiol, 1986. **81**(1): p. 92-96.
173. Kato, R., et al., *Characterization of a thermostable DNA photolyase from an extremely thermophilic bacterium, Thermus thermophilus HB27*. J Bacteriol, 1997. **179**(20): p. 6499-503.
174. Ueda, T., et al., *Identification and characterization of a second chromophore of DNA photolyase from Thermus thermophilus HB27*. J Biol Chem, 2005. **280**(43): p. 36237-43.
175. Massey, V., *The chemical and biological versatility of riboflavin*. Biochem Soc Trans, 2000. **28**(4): p. 283-96.
176. Schleicher, E., et al., *Light-generated radical-pairs in BLUF-Domains*. Manuscript in progress.
177. Wu, Q., W.H. Ko, and K.H. Gardner, *Structural requirements for key residues and auxiliary portions of a BLUF domain*. Biochemistry, 2008. **47**(39): p. 10271-80.
178. Okajima, K., et al., *Fate determination of the flavin photoreceptions in the cyanobacterial blue light receptor TePixD (Tll0078)*. J Mol Biol, 2006. **363**(1): p. 10-8.
179. Hasegawa, K., S. Masuda, and T.A. Ono, *Spectroscopic analysis of the dark relaxation process of a photocycle in a sensor of blue light using FAD (BLUF) protein Slr1694 of the cyanobacterium Synechocystis sp. PCC6803*. Plant Cell Physiol, 2005. **46**(1): p. 136-46.
180. Fukushima, Y., et al., *Photoreactions of Tyr8- and Gln50-mutated BLUF domains of the PixD protein of Thermosynechococcus elongatus BP-1: photoconversion at low temperature without Tyr8*. Biochemistry, 2008. **47**(2): p. 660-9.
181. Dragnea, V., et al., *Time-resolved spectroscopic studies of the AppA blue-light receptor BLUF domain from Rhodobacter sphaeroides*. Biochemistry, 2005. **44**(49): p. 15978-85.

-
182. Toh, K.C., et al., *On the signaling mechanism and the absence of photoreversibility in the AppA BLUF domain*. Biophys J, 2008. **95**(1): p. 312-21.
 183. Rao, F., et al., *Catalytic mechanism of cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase: a study of the EAL domain-containing RocR from Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol, 2008. **190**(10): p. 3622-31.
 184. Polissi, A., et al., *Changes in Escherichia coli transcriptome during acclimatization at low temperature*. Res Microbiol, 2003. **154**(8): p. 573-80.
 185. White-Ziegler, C.A., et al., *Low temperature (23 degrees C) increases expression of biofilm-, cold-shock- and RpoS-dependent genes in Escherichia coli K-12*. Microbiology, 2008. **154**(Pt 1): p. 148-66.
 186. Ahmad, M., et al., *Magnetic intensity affects cryptochrome-dependent responses in Arabidopsis thaliana*. Planta, 2007. **225**(3): p. 615-24.
 187. Liedvogel, M., et al., *Chemical magnetoreception: bird cryptochrome 1a is excited by blue light and forms long-lived radical-pairs*. PLoS ONE, 2007. **2**(10): p. e1106.
 188. Yoshii, T., M. Ahmad, and C. Helfrich-Förster, *Cryptochrome Mediates Light-Dependent Magnetosensitivity of Drosophila's Circadian Clock*. PLoS Biology, 2009. **7**(4).
 189. Gegear, R.J., et al., *CRYPTOCHROME mediates light-dependent magnetosensitivity in Drosophila*. Nature, 2008. **454**: p. 1014–1018.
 190. Han, Y., et al., *A eukaryotic BLUF domain mediates light-dependent gene expression in the purple bacterium Rhodobacter sphaeroides 2.4.1*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 2004. **101**(33): p. 12306-11.
 191. Bayram, O., et al., *More than a repair enzyme: Aspergillus nidulans photolyase-like CryA is a regulator of sexual development*. Mol Biol Cell, 2008. **19**(8): p. 3254-62.
 192. Todo, T., et al., *Flavin adenine dinucleotide as a chromophore of the Xenopus (6-4) photolyase*. Nucleic Acids Res, 1997. **25**(4): p. 764-8.
 193. Schleicher, E., et al., *Electron nuclear double resonance differentiates complementary roles for active site histidines in (6-4) photolyase*. J Biol Chem, 2007. **282**(7): p. 4738-47.
 194. Usman, A., et al., *Spectroscopic characterization of a (6-4) photolyase from the green alga Ostreococcus tauri*. J Photochem Photobiol B, 2009.
 195. Ozgur, S. and A. Sancar, *Purification and properties of human blue-light photoreceptor cryptochrome 2*. Biochemistry, 2003. **42**(10): p. 2926-32.
 196. Kim, J.K. and B.S. Choi, *The solution structure of DNA duplex-decamer containing the (6-4) photoproduct of thymidyl(3'-->5')thymidine by NMR and relaxation matrix refinement*. Eur J Biochem, 1995. **228**(3): p. 849-54.
 197. Coesel, S., et al., *Diatom PtCPF1 is a new cryptochrome/photolyase family member with DNA repair and transcription regulation activity*. EMBO Rep, 2009. **10**(6): p. 655-61.
 198. Jorns, M.S., et al., *Chromophore function and interaction in Escherichia coli DNA photolyase: reconstitution of the apoenzyme with pterin and/or flavin derivatives*. Biochemistry, 1990. **29**(2): p. 552-61.
 199. Kundu, L.M., et al., *Cleavable substrate containing molecular beacons for the quantification of DNA-photolyase activity*. Chembiochem, 2002. **3**(11): p. 1053-60.
 200. Zikihara, K., et al., *Involvement of electron transfer in the photoreaction of zebrafish Cryptochrome-DASH*. Photochem Photobiol, 2008. **84**(4): p. 1016-23.